

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«GSK3a/b ως θεραπευτικός στόχος στο καρκίνο»**

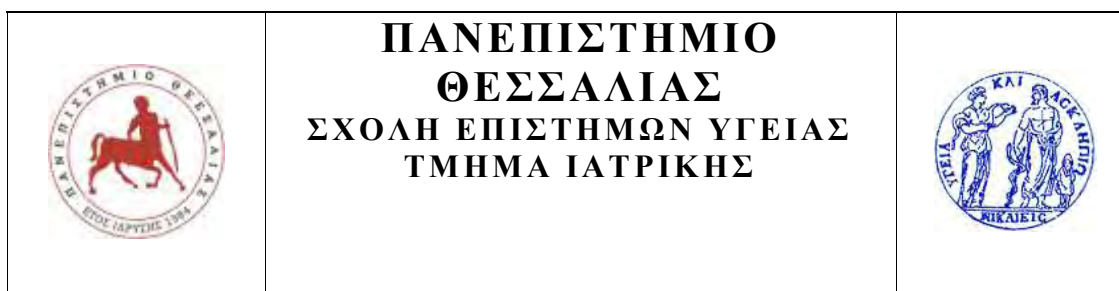
**ΓΕΩΡΓΙΟΥ ΑΝΤΡΗ**

*Τεχνολόγος Ιατρικών Εργαστηρίων*

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

- **ΔΗΜΑΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ**, Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακολογίας Παν/μιου Θεσσαλίας
- **ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ**, Καθηγήτρια Γενετικής Παν/μιου Θεσσαλίας
- **ΤΡΑΧΑΝΑ ΒΑΡΒΑΡΑ**, Επίκουρη καθηγήτρια Κυτταρικής Βιολογίας Παν/μιου Θεσσαλίας

ΛΑΡΙΣΑ, 2018



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»**

**THESIS**

**« «GSK3a/b as cancer therapeutic target» »**

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Θα θελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή μου κ. Δήμα Κωνσταντίνο, κυρίως για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, και την υπομονή που έκανε κατά τη διάρκεια υλοποίησης της πτυχιακής εργασίας. Όπως επίσης και για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση του, για την επίλυση διάφορων θεμάτων. Τέλος, αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω από καρδιάς και να αφιερώσω αυτή μου την πτυχιακή εργασία στην οικογένεια μου, η οποία με στήριξε καθ'όλη τη διάρκεια των σπουδών μου με ποικίλους τρόπους, φροντίζοντας για την καλύτερη δυνατή μόρφωση μου.



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η κινάση της συνθάσης γλυκογόνου-3 (GSK3) μπορεί να είναι η πιο πολυσύχναστη κινάση στα περισσότερα κύτταρα, με πάνω από 100 γνωστά υποστρώματα για πρόσδεση με αυτά. Πώς η GSK3 διατηρεί τον έλεγχο για την εκλεκτική φωσφορυλίωση κάθε υποστρώματος και γιατί εξελίχθηκε ευνοϊκά έτσι ώστε να αναλαμβάνει τόσο μεγάλη ευθύνη; Η GSK3 πρέπει να είναι ιδιαίτερα προσαρμόσιμη για την ενσωμάτωση νέων υποστρωμάτων και σε αυτήν την εργασία αναλύονται οι ξεχωριστές ιδιότητες της GSK3 που μπορεί να συμβάλλουν στην ικανότητά της να εκπληρώνει τους ρόλους της σε πολλαπλές οδούς σηματοδότησης.

Η GSK3b είναι μια μοναδική κινάση η οποία είναι συστατικά δραστική σε κύτταρα αδρανοποιημένα αλλά και σε μη διεγερμένα κύτταρα. Η GSK3b έχει εμπλακεί σε ένα ευρύ φάσμα ασθενειών που περιλαμβάνουν τον νευροεκφυλισμό, την φλεγμονή και την ίνωση, τον μη ινσουλινο-εξαρτώμενο σακχαρώδη διαβήτη και τον καρκίνο. Είναι ένας ρυθμιστής της επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων με τη μεσολάβηση του (nuclear Factor)NF-κB, η οποία παρείχε μια αρχική σκέψη για την ανάπτυξη αναστολέων της δράσης της GSK3 που στοχεύουν κακοήθεις όγκους. Όσον αφορά τις πρόσφατες μελέτες, πολλές από αυτές αναφέρθηκαν κατά την τελευταία δεκαετία στον εντοπισμό της GSK3b ως πιθανό θεραπευτικό στόχο σε περισσότερους από 15 διαφορετικούς τύπους καρκίνου. Ενώ η δραστική GSK3b εκφράζεται στους πυρήνες των καρκινικών κυττάρων, η ανώμαλη πυρηνική συσσώρευση της GSK3b έχει αναγνωριστεί ως «σφραγίδα» που αφήνουν τα καρκινικά κύτταρα σε κακοήθεις όγκους διαφορετικής προέλευσης.

Αυτή η επισκόπηση εστιάζει στην προκλινική και κλινική ανάπτυξη των αναστολέων της GSK3 και στην πιθανή θεραπευτική επίδραση της στόχευσης της GSK3b σε διαφορετικού τύπου καρκίνου που προσβάλλουν τον άνθρωπο.

## **ABSTRACT**

The glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) may be the most crowded kinase in most cells, with over 100 known substrates for tethering with them. The GSK3 must be highly customizable for the incorporation of new substrates and in this task analyzes the distinct qualities of GSK3 which may contribute to its ability to fulfill its roles in multiple signaling pathways.

GSK3b is a unique kinase which is constitutively active in both inactivated and without excitation cells. GSK3b has been implicated in a wide range of diseases including neurodegeneration, inflammation and fibrosis, non-insulin-dependent diabetes mellitus and cancer. It is a NF- $\kappa$ B nuclear factor survival regulator, which provided an initial thought for the development of inhibitors of GSK3 targeting malignant tumors. With regard to recent studies, many have been reported over the last decade to identify GSK3b as a potential therapeutic target for more than 15 different types of cancer. While active GSK3b is expressed in the nucleus of cancer cells, the abnormal nuclear accumulation of GSK3b has been identified as a "sign" that leaves cancer cells in malignant tumors of different origins.

This review focuses on the preclinical and clinical development of GSK3 inhibitors and on the potential therapeutic effect of targeting GSK3b to different types of cancer that affect humans.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup> : ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ – Εισαγωγικά Χαρακτηριστικά</b>	
• Περίληψη	Σελ. 4
• Abstract	Σελ. 5
• Καρκίνος	Σελ. 8
<b>1.1.1</b> Ορισμός	Σελ. 8-9
<b>1.1.2</b> Γενικά χαρακτηριστικά	Σελ. 9-10
<b>1.1.3</b> Αίτια	Σελ. 10-11
<b>1.2</b> GSK3a/b (Glycogen Synthase Kinase 3 a/b)	Σελ. 11
<b>1.2.1</b> Γενικά χαρακτηριστικά	Σελ. 11
<b>1.2.2</b> Δομικά χαρακτηριστικά	Σελ. 12-13
<b>1.2.3</b> Μηχανισμός δράσης	Σελ. 13
<b>1.2.3.1</b> Έκφραση	Σελ. 13-14
<b>1.2.3.2</b> Γενετικοί πολυμορφισμοί	Σελ. 14-15
<b>1.2.3.3</b> Εναλλακτική συρραφή	Σελ. 15
<b>1.2.4</b> Ρύθμιση φωσφορυλίωσης	Σελ. 15-16
<b>1.2.4.1</b> Ρύθμιση μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων	Σελ. 16-21
<b>1.2.4.2</b> Φωσφορυλίωση υποστρώματος και βιοδιαθεσιμότητα	Σελ. 22-23

<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup>: ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ - ΡΟΛΟΣ GSK3a/b ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΚΑΡΚΙΝΟΥ</b>	
<b>2.1</b> Διαφορική δράση και ρύθμιση GSK3a και GSK3b	Σελ. 24-27
<b>2.2</b> Μονοπάτι δράσης GSK3a/b στον καρκίνο	Σελ. 28-29
<b>2.3.1</b> Καρκίνος μαστού και προστάτη	Σελ. 31
<b>2.3.1.1</b> Καρκίνος του μαστού	Σελ. 31
<b>2.3.1.2</b> Καρκίνος του προστάτη	Σελ. 32
<b>2.3.2</b> Καρκίνος του παγκρέατος	Σελ.32-35
<b>2.3.3</b> Καρκίνος των πνευμόνων	Σελ. 35
<b>2.3.4</b> Καρκίνος του παχέος εντέρου	Σελ. 36
<b>2.3.5</b> Άλλοι τύποι καρκίνου	Σελ. 36-38
<b>2.4</b> Θεραπεία άλλων ασθενειών	Σελ. 38
<b>2.4.1</b> Οστεοπόρωση	Σελ. 38-39
<b>2.4.2</b> Καρδιακή υπερτροφία	Σελ.39
<b>2.4.3</b> Υπέρταση	Σελ. 40
<b>2.5</b> Η GSK3 στην κλινική πράξη	Σελ.40-41
<b>2.6</b> Ρόλος GSK3 σαν φαρμακολογικός στόχος στον καρκίνο	Σελ.42-43
<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	Σελ.44-45
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	Σελ.46-60

## ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### Εισαγωγικά Χαρακτηριστικά

#### 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

##### 1.1 Καρκίνος

Η ανανέωση των ιστών του ανθρώπινου οργανισμού προϋποθέτει την ύπαρξη περίπλοκων μηχανισμών ελέγχου για τον συντονισμό της συμπεριφοράς κάθε ξεχωριστού κυττάρου με τις ανάγκες ολόκληρου του οργανισμού. Κάθε κύτταρο πρέπει να διαιρείται όταν χρειάζονται νέα κύτταρα του συγκεκριμένου είδους και να σταματά να διαιρείται όταν δεν χρειάζονται πια. Πρέπει να ζει όσο είναι απαραίτητο για τις λειτουργίες του οργανισμού και να αποδομείται όταν δεν είναι. Πρέπει να διατηρεί τον κατάλληλο και εξειδικευμένο χαρακτήρα του και να καταλαμβάνει τη σωστή θέση χωρίς να «ξεστρατίζει» σε άλλες επικράτειες.

Από την άλλη πλευρά, όταν ένα κύτταρο υποστεί μια γενετική τροποποίηση που του επιτρέπει να επιβιώνει και να διαιρείται ενώ δεν θα έπρεπε, θα επέλθει και δυνητικά καταστροφική απώλεια του ελέγχου που θα οδηγήσει σε παραγωγή θυγατρικών κυττάρων. Σε αυτή την περίπτωση, η οργάνωση του ιστού και τελικά και ολόκληρου του οργανισμού, μπορεί να διαταραχθεί από έναν συνεχώς αυξανόμενο κλώνο ανώμαλων κυττάρων. Αυτή η καταστροφική εξέλιξη συμβαίνει στον καρκίνο.

##### 1.1.1 Ορισμός

Ο καρκίνος αναπτύσσεται όταν συμβούν τα εξής γεγονότα:

- Τα φυσιολογικά κύτταρα του οργανισμού και οι απόγονοί τους αναπαράγονται αψηφώντας τους φυσιολογικούς περιορισμούς.
- Τα κύτταρα διεισδύουν και αποικίζουν χώρους και ιστούς του οργανισμού που κανονικά αποτελούν την επικράτεια άλλων κυττάρων.

Ο ιδιαίτερος κίνδυνος της εμφάνισης του καρκίνου δημιουργείται από τον συνδυασμό αυτών των δύο γεγονότων. Τα κύτταρα που έχουν την πρώτη όχι όμως και τη δεύτερη ιδιότητα πολλαπλασιάζονται υπέρμετρα αλλά παραμένουν συναθροισμένα σε μια



ενιαία μάζα και μπορεί να δημιουργήσουν έναν όγκο (ή νεόπλασμα) (Torre L. et al., 2015).

Στην περίπτωση αυτή ο όγκος χαρακτηρίζεται ως καλοήθης και συνήθως μπορεί ν' αφαιρεθεί πλήρως με χειρουργική επέμβαση. Ένας όγκος είναι καρκινικός μόνο αν τα κύτταρά του έχουν την ικανότητα να διεισδύουν στους περιβάλλοντες ιστούς. Στην περίπτωση αυτή, ο όγκος χαρακτηρίζεται ως κακοήθης. Τα κακοήθη καρκινικά κύτταρα με τη διεισδυτική ικανότητά τους μπορεί να εγκαταλείψουν τον πρωτοπαθή όγκο, να εισέλθουν στην αιματική κυκλοφορία ή στα λεμφαγγεία και να σχηματίσουν δευτεροπαθείς όγκους, ή αλλιώς μεταστάσεις, σε άλλες θέσεις του σώματος.

### 1.1.2 Γενικά χαρακτηριστικά

Διαφορετικοί τύποι καρκίνων απαιτούν διαφορετικούς συνδυασμούς ιδιοτήτων. Ωστόσο, υπάρχει μια σειρά κρίσιμων και συγκεκριμένων χαρακτηριστικών των καρκινικών κυττάρων που τα διακρίνει από τα φυσιολογικά κύτταρα και είναι τα εξής:

- Τα καρκινικά κύτταρα βασίζονται λιγότερο σε σήματα από άλλα κύτταρα για την αύξηση, επιβίωση και διαίρεσή τους. Συχνά αυτό συμβαίνει επειδή περιέχουν μεταλλάξεις σε συστατικά των οδών κυτταρικής σηματοδότησης μέσω των οποίων τα κύτταρα απαντούν σε τέτοια μηνύματα.

Για παράδειγμα, μια μετάλλαξη στο γονίδιο *ras* μπορεί να οδηγήσει σε παραγωγή ενός ενδοκυττάριου σήματος για πολλαπλασιασμό παρότι δεν υπάρχει το εξωκυττάριο σήμα το οποίο κανονικά θα ήταν απαραίτητο για την παραγωγή του.

- Τα καρκινικά κύτταρα είναι λιγότερο ευπαθή από τα φυσιολογικά κύτταρα στο θάνατο με απόπτωση. Η αποστροφή για την αυτοκτονία συχνά προκαλείται από μεταλλάξεις σε γονίδια που ρυθμίζουν το ενδοκυττάριο πρόγραμμα θανάτου.

Για παράδειγμα, περίπου στο 50% των καρκίνων του ανθρώπου ανιχνεύονται μεταλλάξεις στο γονίδιο *p53*. Η πρωτεΐνη *p53* κανονικά συμμετέχει σ' έναν μηχανισμό ελέγχου που αναγκάζει τα κύτταρα είτε να σταματήσουν να διαιρούνται είτε να πεθάνουν με απόπτωση όταν το DNA τους έχει υποστεί βλάβη. Για παράδειγμα, η θραύση των χρωμοσωμάτων, αν δεν επιδιορθωθεί, γενικά αναγκάζει το κύτταρο ν' αυτοκτονήσει. Αν όμως το κύτταρο έχει βλάβη στο γονίδιο *p53*, μπορεί να

επιβιώσει και να συνεχίσει να διαιρείται παράγοντας πολύ ανώμαλα θυγατρικά κύτταρα που έχουν τη δυνατότητα να γίνουν ακόμα πιο κακοήγη.

- Αντίθετα από τα περισσότερα φυσιολογικά κύτταρα, τα καρκινικά κύτταρα συχνά πολλαπλασιάζονται ατέρμονα. Τα περισσότερα σωματικά κύτταρα του ανθρώπου όταν υποβάλλονται σε καλλιέργεια πραγματοποιούν έναν περιορισμένο αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων και μετά σταματούν οριστικά, μάλλον επειδή έχουν βραχυνθεί πάρα πολύ τα τελομερίδια στα δύο άκρα των χρωμοσωμάτων τους. Τα καρκινικά κύτταρα παραβιάζουν αυτό το όριο ενεργοποιώντας την τελομεράση, το ένζυμο που διατηρεί το μήκος των τελομεριδίων.

- Τα περισσότερα καρκινικά είναι γενετικώς ασταθή και έχουν πολύ αυξημένη συχνότητα μεταλλάξεων.

- Τα καρκινικά κύτταρα έχουν παθολογική διεισδυτικότητα. Αυτό συχνά οφείλεται στο γεγονός ότι δεν διαθέτουν ειδικά μόρια κυτταρικής προσκόλλησης που συγκρατούν τα φυσιολογικά κύτταρα στη σωστή θέση.

- Τα καρκινικά κύτταρα συχνά επιβιώνουν και πολλαπλασιάζονται σε ξένους ιστούς δημιουργώντας μεταλλάξεις, ενώ τα περισσότερα φυσιολογικά κύτταρα αν βρεθούν σ' έκτοπη θέση πεθαίνουν. Ακόμα δεν είναι γνωστό πλήρως ποιες μεταλλάξεις προσδίδουν αυτή την ικανότητα (Torre L. et al., 2015).

### 1.1.3 Αίτια

Μερικές φορές, οι επικίνδυνες μεταλλάξεις είναι εκείνες που κάνουν το προϊόν του προβληματικού γονιδίου υπερδραστήριο. Αυτές οι μεταλλάξεις έχουν επικρατή δράση, δηλαδή για να προκληθούν προβλήματα αρκεί να μεταλλαχθεί μόνο το ένα αλληλόμορφο του γονιδίου. Το μεταλλαγμένο γονίδιο αποκαλείται ογκογονίδιο, ενώ το αντίστοιχο φυσιολογικό γονίδιο αποκαλείται πρωτοογκογονίδιο (Hegde M. et al., 2013). Οι τρόποι με τους οποίους μπορεί να συμβεί η μετατροπή ενός πρωτοογκογονιδίου σε ογκογονίδιο είναι αυτοί που προκαλούν την εμφάνιση καρκίνου και είναι οι εξής:

- Μετάλλαξη στην κωδικοποιητική αλληλουχία του γονιδίου η οποία προκαλεί την παραγωγή φυσιολογικών ποσοτήτων μιας υπερδραστήριας πρωτεΐνης.

- Επαύξηση γονιδίων η οποία προκαλεί την υπέρμετρη παραγωγή μιας φυσιολογικής πρωτεΐνης.

- Αναδιάταξη των χρωμοσωμάτων κατά την οποία μια γειτονική ρυθμιστική αλληλουχία DNA μπορεί να προκαλέσει την υπερπαραγωγή μιας φυσιολογικής πρωτεΐνης είτε η σύντηξη με ένα ενεργά μεταγραφόμενο γονίδιο προκαλεί την υπερπαραγωγή μια χιμαιρικής πρωτεΐνης. Εναλλακτικά, η χιμαιρική πρωτεΐνη είναι υπερδραστήρια.

## **1.2 GSK3a/b (Glycogen Synthase Kinase 3 a/b)**

Η 3β-κινάση της συνθάσης του γλυκογόνου (GSK3b), γνωστή και ως κινάση της ανθρώπινης πρωτεΐνης tau (TPK I), είναι μία πρωτεϊνική κινάση θρεονίνης-τυροσίνης που ανακαλύφθηκε το 1980. Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη μετάδοση ρυθμιστικών και αναπτυξιακών σημάτων από τα κύτταρα, τις κυτταροσκελετικές πρωτεΐνες και τους μεταγραφικούς παράγοντες.

### **1.2.1 Γενικά χαρακτηριστικά**

Το αρχικό ενδιαφέρον για την GSK3b ως στόχος του διαβήτη προέκυψε από τη δυνατότητά της να ρυθμίζει τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα (Embi et al. 1980). Η GSK3b θεωρήθηκε πιθανός στόχος φαρμακευτικής αγωγής όταν επιβεβαιώθηκε σε *in vitro* και *in vivo* πειράματα η σημαντικότητά της στον διαβήτη τύπου 2 και την παχυσαρκία (Gum et al., 2003; Ring et al., 2003). Ο στόχος αυτός απέκτησε μεγαλύτερο ενδιαφέρον όταν ανακαλύφθηκε ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο και σε άλλες παθοφυσιολογίες. Η συγκεκριμένη συνθάση GSK3b εμπλέκεται στη νόσο Alzheimer και σε διαταραχές της διάθεσης (Hsiung et al., 2003). Πρόσφατα έχει συσχετισθεί και με την οστεοπόρωση (Smith and Frenkel, 2005), την αθηροσκλήρωση (Robertson et al., 2006) και τον καρκίνο (Inoki et al., 2006). Επίσης έχει αναφερθεί ο ρόλος που διαδραματίζει στην καρδιακή υπερτροφία (Morisco et al., 2001). Η μοναδικότητά της έγκειται στο γεγονός ότι είναι συνεχώς ενεργή εντός των κυττάρων και η αναστολή της είναι υπεύθυνη για την κυτταρική σηματοδότηση (Inoki et al., 2006). Η φωσφορυλίωση των υπολειμμάτων τυροσίνης στη θέση 216 οδηγεί στην αδιάκοπη ενεργότητα της GSK3b και πιστεύεται ότι είναι ένας σημαντικός στόχος για τη μετάδοση των σημάτων (Bhat et al., 2000; Sayas et al., 2006). Η διαλεύκανση της δομής της GSK3b και των τρόπων αλληλεπίδρασης με τους προσδέτες της έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Η Τράπεζα Πρωτεϊνικών Δεδομένων (PDB) (Berman et al., 2000) έχει καταγεγραμμένα διάφορες ακτινογραφικές δομές

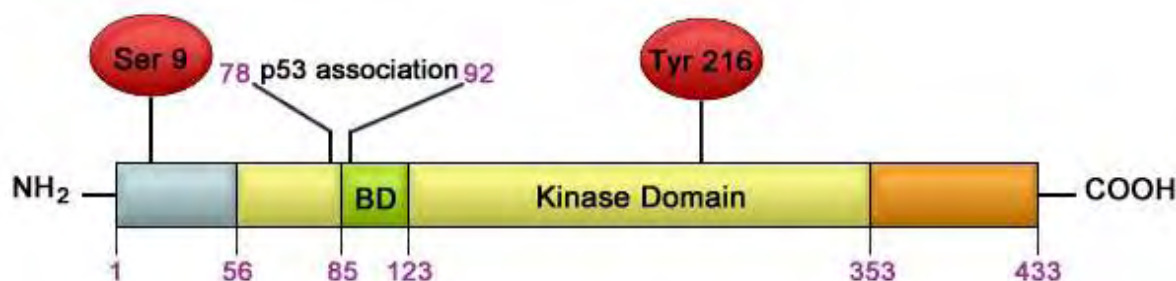
των προσδετών της GSK3b. Επιπρόσθετα σε αυτές τις ακτινογραφικές δομές υπάρχουν και κρυσταλλικές, ακτινογραφικές δομές που έχουν καταγραφεί στη βιβλιογραφία (Bussiere et al., 2002).

### 1.2.2 Δομικά χαρακτηριστικά

Λόγω της ολοένα και αυξανόμενης σημαντικότητας της GSK3b σαν θεραπευτικός στόχος σε πολλές ασθένειες, κρίνεται απαραίτητη η μελέτη των διαφορικών χαρακτηριστικών της GSK3b σε σχέση με τις αλληλουχίες της και τα δεδομένα από την ανάλυσή της με κρυσταλλογραφία ακτίνων X. Οι κρυσταλλικές δομές της GSK3b χαρακτηρίζονται από μέτρια έως υψηλή ανάλυση και πιο συγκεκριμένα 3,2Å έως 1,8Å ενώ οι προσδέτες που συνδέονται με την πρωτεΐνη ανήκουν σε διαφορετικά χημικά ικρίωματα (Gadakar et al., 2007). Μια ανάλυση πολλαπλών αλληλουχιών (MSA - Multiple Sequence Analysis) της πρωτεϊνικής δομής αποκάλυψε ότι οι αλληλουχίες αφορούν όλα τα είδη και παρουσιάζουν εξαιρετικό βαθμό διατήρησης στη θέση πρόσδεσης με εξαίρεση της περιοχής N και O (Thompson et al., 1994). Με βάση μια μοριακή μελέτη αυτών των δομών, παρατηρήθηκε ότι η GSK3 a/b έχει τρεις θέσεις δέσμησης οι οποίες είναι οι εξής:

- Θέση δέσμησης για το ATP (Leu132, Tyr134, Val135, Pro136, Arg141)
- Θέση δέσμησης για το ATP (Leu132, Tyr134, Val135, Pro136, Arg141)
- Θέση δέσμησης της αξίνης(axin) (Lys85, Asp133, Val135, Lys183, Asp200)
- Θέση εκκίνησης για την Arg96 (Arg180, Ser203, Lys205, Val214)

Η δεύτερη είναι η μικρότερη σε μέγεθος αλληλουχιών θέση δέσμησης σε σχέση με τις άλλες δυο ενώ μπορεί να θεωρηθεί ως γενικότερη επέκταση της θέσης δέσμησης για το ATP στην συγκεκριμένη συνθήκη.



**Εικόνα 1:** Πρωτεϊνική δομή της GSK3 κινάσης

[Πηγή: <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GSK3BID40761ch3q13.html>]

Με αυτές τις πληροφορίες από την κρυσταλλογραφία με ακτίνες x έχουν αποκαλυφθεί τόσο η κύρια αλυσίδα όσο και οι πλευρικές αλυσίδες της GSK3b. Η ανάλυση αυτή έχει ρίξει φως ακόμα και στον βαθμό ευκαμψίας ή ακαμψίας στις θέσεις πρόσδεσης του Ca της συγκεκριμένης κινάσης GSK3b ενώ βοήθησαν και στην αποκάλυψη και μεγαλύτερη κατανόηση της κινητικότητας και της μείζονος γεωμετρίας της (Bjornsti et al., 2004).

Ακόμα, μπόρεσε να παρατηρηθεί το 3D μοντέλο της GSK3b έτσι ώστε στο μέλλον να δοθεί η δυνατότητα ανάπτυξης διαμορφωτών ή αντιγράφων της για θεραπευτικούς σκοπούς. Παρατηρήθηκε πάντως ότι ο κύριος σκελετός (κύριες αλυσίδες) της κινάσης GSK3b είναι σχεδόν άκαμπτος ενώ ταυτόχρονα οι πλευρικές της αλυσίδες παρουσιάζουν ιδιαίτερη ευκαμψία και κινητικότητα, κάτι το οποίο συμβαίνει και με τις θέσεις πρόσδεσης που αναφέρθηκαν παραπάνω.

Τέλος, οποιεσδήποτε μεταλλάξεις και αλλαγές στις αλληλουχίες των καταλοίπων αμινοξέων της GSK3b που γειτνιάζουν με τα κατάλοιπα αμινοξέων των θέσεων πρόσδεσης επηρεάζουν επίσης την κινητικότητα του σκελετού όπως προκύπτει από αυτές τις μελέτες κρυσταλλογραφίας.

### **1.2.3 Μηχανισμός δράσης**

Σε γενικές γραμμές, σε αντίθεση με την κοινή αντίληψη ότι η GSK3 ρυθμίζεται μόνο με τη σερινική φωσφορυλίωση και τη δέσμευση του Axin στην δεύτερη θέση δέσμευσης, υπάρχει μια πληθώρα μηχανισμών που καθοδηγούν τις δράσεις της GSK3 και την λειτουργικότητά της μέσα στον οργανισμό. Αυτοί οι μηχανισμοί προφανώς παρέχουν τις βάσεις έτσι ώστε η GSK3 να επιλέξει ανάμεσα στα πολλά υποστρώματά της σαν απόκριση σε κάθε οδό σηματοδότησης που προσκρούει σε αυτήν.

#### **1.2.3.1 Έκφραση**

Η GSK3b σπάνια φαίνεται να ρυθμίζεται η λειτουργία της από αλλαγές που προκαλούνται στην έκφρασή της καθώς είναι λίγες οι περιπτώσεις όπου έχουν αναφερθεί ή παρατηρηθεί μεταβολές στην λειτουργία της GSK3b λόγω διαφορετικής έκφρασης των γονιδίων της. Παρ' όλα αυτά, μπορούν να εμφανιστούν τεράστιες αλλαγές στα επίπεδα της GSK3b, όπως για παράδειγμα υπάρχει μία μεγάλη, περίπου

δεκαπλάσια αύξηση της GSK3b στον υποτύπο Th17 των T κυττάρων, σε σχέση με άλλα T κύτταρα του οργανισμού (Beurel et al., 2011) αλλά και 3-4 φορές μεγαλύτερες αλλαγές συμβαίνουν στα επίπεδα και των δύο ισομορφών της GSK3 (GSK3 a/b) στον εγκέφαλο ποντικών κατά την ανάπτυξη (Beurel et al., 2012). Ωστόσο, αυτά τα παραδείγματα είναι οι εξαιρέσεις τόσο στην σταθερή έκφραση των γονιδίων της GSK3 στον οργανισμό όσο και στα επίπεδά της. Τα επίπεδα έκφρασης της GSK3b μεταβάλλονται σε πιθανή ανταπόκριση ή απάντηση σε κάποια θεραπεία. Ενδιαφέρον αποτελεί το γεγονός ότι πιθανολογείται ασθενείς με διπολική διαταραχή να έχουν αυξημένη συχνότητα παραλλαγής του αριθμού αντιγράφων στον γενετικό τόπο για την GSK3b (Lachman et al., 2007). Μελλοντικές μελέτες που αποσκοπούν στην αναγνώριση των μοριακών μηχανισμών που ρυθμίζουν την έκφραση της GSK3, μπορούν να παρέχουν σημαντικές πληροφορίες για την ανάπτυξη νέων παρεμβάσεων ικανών να μεταβάλλουν τα κυτταρικά επίπεδα της GSK3 στον οργανισμό.

#### **1.2.3.2 Γενετικοί πολυμορφισμοί**

Ένας αριθμός γενετικών πολυμορφισμών SNPs (Single Nucleotide Polymorfisms) έχουν ταυτοποιηθεί στο γονίδιο που κωδικοποιεί την GSK3b και οι οποίοι ενδέχεται να συνδυάζονται με την ευαισθησία του οργανισμού στην εκδήλωση μια ποικιλίας ασθενειών αλλά και με την απόκριση του οργανισμού σε θεραπευτικές φαρμακευτικές αγωγές. Αυτό είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον σε έρευνες οι οποίες δείχνουν μια συσχέτιση των γενετικών πολυμορφισμών της GSK3b στην εκδήλωση της ασθενειών όπως οι διαταραχές διάθεσης αλλά και σε θεραπευτικά σχήματα για την καταπολέμηση των διαταραχών αυτών (Benedetti et al., 2004a; Benedetti et al., 2004b; Benedetti et al., 2005; Szczepankiewicz et al., 2006a; Adli et al., 2007; Tsai et al., 2008; Inkster et al., 2009; Inkster et al., 2010; Saus et al., 2010).

Εντούτοις, υπάρχουν και άλλες έρευνες οι οποίες δεν δείχνουν καμία συσχέτιση και αλληλεπίδραση ανάμεσα στις διαταραχές διάθεσης και τους γενετικούς πολυμορφισμούς που αφορούν την GSK3b (Nishiguchi et al., 2006; Szczepankiewicz et al., 2006b). Οι γενετικοί πολυμορφισμοί SNPs μπορεί να μεταβάλλουν την έκφραση ή τις δράσεις και την λειτουργία της GSK3, αλλά αυτό παραμένει σε μεγάλο βαθμό κερδοφόρο για τον οργανισμό καθώς ελάχιστα είναι γνωστά για τα τελικά λειτουργικά αποτελέσματα των πολυμορφισμών αυτών. Ωστόσο, ένας GSK3b

πολυμορφισμός που σχετίζεται με τη νόσο του Parkinson αναφέρθηκε ότι αλλοιώνει τη μεταγραφή του GSK3b όσο και του ματίσματός του (Kwok et al., 2005). Εάν πρέπει να σημειωθεί πρόοδος στον τομέα αυτό, θα πρέπει να δοθεί μεγαλύτερη προτεραιότητα σε περαιτέρω μελέτες των λειτουργικών επιπτώσεων των γενετικών πολυμορφισμών της GSK3.

### **1.2.3.3 Εναλλακτική συρραφή**

Η εναλλακτική συρραφή μπορεί να δώσει μορφές της GSK3b που έχουν πολύ διαφορετική λειτουργία από την φυσιολογική (Schaffer et al., 2003, Kwok et al., 2005). Ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει η παραλλαγή GSK3b2 η οποία προκύπτει από εναλλακτική συρραφή και είναι άφθονη στην περιοχή του εγκεφάλου (Mukai et al., 2002). Αυτή η παραλλαγή GSK3b2 παρουσιάζει μια έξτρα περιοχή από την φυσιολογική GSK3b εντός της περιοχής της κινάσης που ρυθμίζεται από τις RNA ελικάσες DDX5 και DDX17 (Samaan et al., 2014).

Σε άλλες έρευνες έχει αναφερθεί ότι η GSK3b2 στοχεύει νευρίτες της περιοχής του εγκεφάλου που βρίσκονται σε αναπτυξιακό στάδιο (Wood-Kaczmar et al., 2009) με στόχο την ευρύτερη ανάπτυξη του νευρικού συστήματος (Castaño et al., 2010). Η GSK3b2, τέλος, εμφανίζει μειωμένη δραστηριότητα σε κάποια, αν όχι όλα, υποστρώματα σε σύγκριση με την GSK3b1 (Mukai et al., 2002, Soutar et al., 2010).

### **1.2.4 Ρύθμιση φωσφορυλίωσης**

Η GSK3 διαθέτει φυσιολογικά 2 ισομορφές, την GSK3a και την GSK3b. Μια θεωρητική ανάλυση διαπίστωσε ότι η GSK3b ισομορφή έχει περισσότερα προβλεπόμενα υποστρώματα από οποιαδήποτε άλλη κινάση (Linding et al., 2007). Ο μέσος όρος των υποστρωμάτων για τις 68 κινάσες που εξετάστηκαν στην συγκεκριμένη έρευνα ήταν 12, η μέση τιμή ήταν 70 υποστρώματα και ο προβλεπόμενος αριθμός υποστρωμάτων για την GSK3b ήταν πάνω από 500 (Linding et al., 2007). Καθώς αυτός ο αριθμός υποστρωμάτων αποτελεί με σιγουριά μια υπερεκτίμηση, έχουν ήδη παρατηρηθεί και αναφερθεί σε άλλες έρευνες τουλάχιστον 100 πρωτεΐνες που φωσφορυλιώνονται από την GSK3b, αν και παραπάνω έρευνες πρέπει να διενεργηθούν προτού θεωρηθούν όλα τα υποστρώματα GSK3b υποστρώματα (Sutherland, 2011).

Παρ' όλα αυτά, ο μεγάλος αριθμός των υποστρωμάτων GSK3b εγείρει πολλά ερωτήματα όπως πώς μπορεί η GSK3b να φωσφορυλιώσει τόσες πρωτεΐνες σε ένα κύτταρο με σύνεση και σωστό ταίριασμα ή γιατί μια κινάση (αν και υπάρχουν στην πραγματικότητα δύο, GSK3a και GSK3b) έχει εξελιχθεί ώστε να φωσφορυλιώνει τόσα πολλά υποστρώματα όταν η φύση έχει τόσες πολλές κινάσες για να επιλέξει; Αν και αυτές οι ερωτήσεις δεν έχουν απαντηθεί απαντηθεί ικανοποιητικά από την επιστημονική κοινότητα, πρέπει να υπάρχουν ορισμένα χαρακτηριστικά της GSK3 που είναι ιδιαίτερα χρήσιμα και ευπροσάρμοστα και τα οποία υπερσχύουν των λειτουργικών περιορισμών και πολυπλοκότητας που απαιτείται για την παροχή διακριτικής ευχέρειας σε πολλά υποστρώματα. Δεδομένου ότι η δραστηριότητα της GSK3 ως κινάσης δεν είναι ιδιαίτερα διαφορετική από την δράση άλλων κινασών, οι μηχανισμοί ρύθμισης της GSK3 είναι ιδιαίτερα προσαρμόσιμοι για ενσωμάτωση σε νέες οδούς σηματοδότησης χωρίς να διαταράσσουν μηχανισμούς που ήδη υπάρχουν.

Έτσι, ένα «κλειδί» για τις δράσεις της GSK3 μπορεί να είναι οι πολλοί και φυσιολογικοί μηχανισμοί που είναι διαθέσιμοι για την ενορχήστρωση των ειδικών δράσεων του υποστρώματος, οι οποίοι συζητούνται στα επόμενα κεφάλαια αυτής της ανασκόπησης.

Ωστόσο, αυτή η επιστημονική αναποφασιστικότητα σε σχέση με τις δράσεις της φαίνεται να οδηγεί στην υπόθεση για πολλαπλές αλληλεπιδράσεις της GSK3 που μπορεί να διαταραχθούν και να οδηγήσουν σε πολλές δράσεις της GSK3 που συμβάλλουν σε πολλαπλούς τύπους ασθενειών. Αρχικά, κατατάχθηκαν οι κρίσιμοι μηχανισμοί που προσδίδουν εξειδίκευση στις οδούς σηματοδότησης και συμπεριλήφθηκαν τα υποστρώματα στην ρυθμιστική φωσφορυλίωση της ίδιας της GSK3, τη ρύθμιση της διαθεσιμότητας του υποστρώματος, τον υποκυτταρικό εντοπισμό της GSK3 και των υποστρωμάτων της καθώς και την ενσωμάτωση της GSK3 σε σύμπλοκα πρωτεϊνών (Jope and Johnson, 2004), κατηγορίες που παραμένουν οι κύριοι μηχανισμοί που είναι γνωστό ότι ρυθμίζουν την GSK3

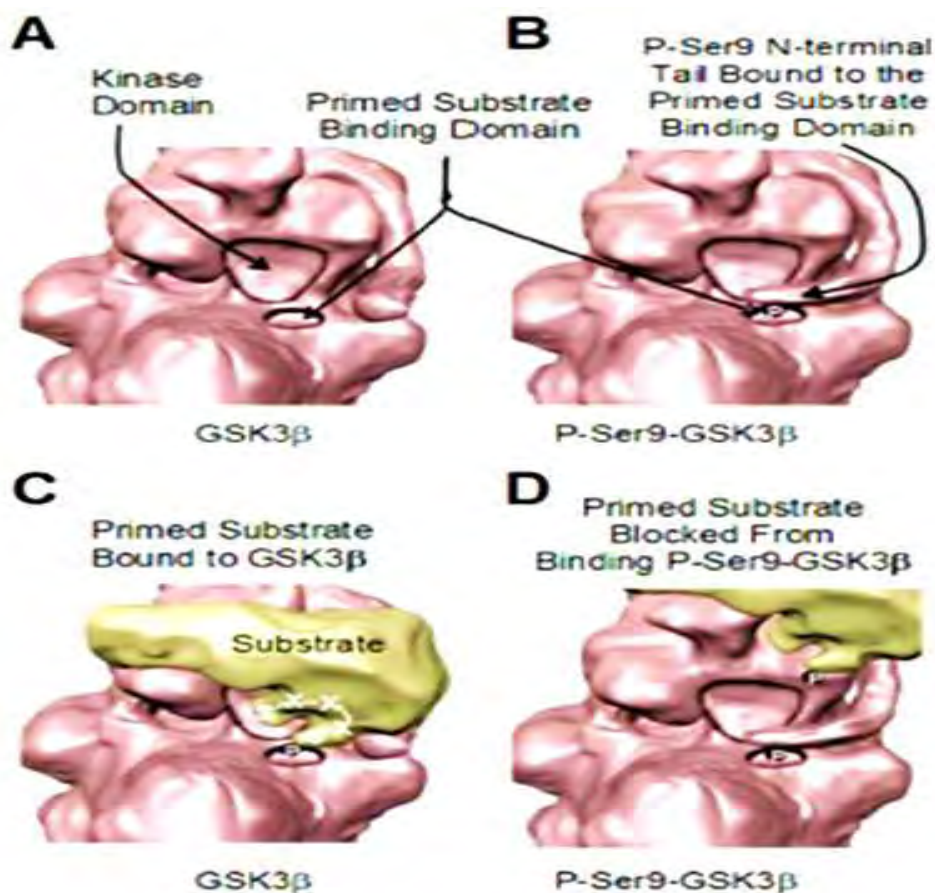
#### **1.2.4.1 Ρύθμιση μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων**

Η ανασταλτική φωσφορυλίωση της σερίνης είναι ο μηχανισμός που εξετάζεται πιο συχνά και ρυθμίζει τη δραστηριότητα της GSK3, αν και η περίπλοκη "ομορφιά" αυτού του μηχανισμού είναι συχνά υποτιμημένη. Δύο βασικές λειτουργικές περιοχές



της GSK3 έχουν ταυτοποιηθεί, μια περιοχή δέσμευσης του αρχικού υποστρώματος, η οποία προσλαμβάνει τα κατάλληλα υποστρώματα για την GSK3 και μια περιοχή κινάσης που φωσφορυλιώνει το υπόστρωμα αυτό (Frame et al, 2001, ter Haar et al., 2001; Dajani et al., 2003). Η πρώτη περιοχή παρέχει μία θέση σύνδεσης για τα περισσότερα υποστρώματα ειδικά για την GSK3, εκείνα που προϋπάρχουν όντας ήδη φωσφορυλιωμένα. Αν και η GSK3 μπορεί να φωσφορυλιώσει ορισμένα υποστρώματα που δεν είναι ήδη φωσφορυλιωμένα σε θέσεις Ser-Pro, ο συνηθέστερος στόχος για φωσφορυλίωση από την GSK3 είναι η προ-φωσφορυλιωμένη αλληλουχία S/TXXXS/T(P), όπου η GSK3 τοποθετεί τέσσερα N-κατάλοιπα σερίνης/θρεονίνης σε μια ήδη φωσφορυλιωμένη θέση σερίνης/θρεονίνης. Ωστόσο, ο αριθμός των παρεμβαλλόμενων καταλοίπων αμινοξέων μεταξύ της αρχικής θέσης και της θέσης στόχου της GSK3 μπορεί να είναι μεγαλύτερος (Cole et al., 2004) ή μικρότερος (Singh et al., 2012) από τέσσερα, χωρίς να προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι η τρισδιάστατη δομή του υποστρώματος επηρεάζει τις αλληλεπιδράσεις του με την GSK3.

Ο μηχανισμός της πρωταρχικής φωσφορυλίωσης επιτρέπει στο υπόστρωμα να δεσμεύεται στην περιοχή αρχικής δέσμευσης του υποστρώματος μετατρέποντας έτσι τους στόχους σερίνης/θρεονίνης σε ευπροσάρμοστους έτσι ώστε να διευκολύνεται η φωσφορυλίωση του υποστρώματος από την περιοχή της κινάσης στην πρωτεϊνική μονάδα της GSK3.



**Εικόνα 2:** Φωσφορυλίωση Σερίνης 9 στην GSK3 κινάση.[Πηγή: PDB ID: 4nm0, PDB ID: 4nm3, Stamos et al, 2014]

**A)** Πρωτεϊνική δομή της GSK3 μετά από κρυσταλλογραφία. Παρουσιάζεται η περιοχή της κινάσης και η αρχική θέση δέσμευσης του υποστρώματος (Stamos et al, 2014).

**B)** N-τελικό ήδη φωσφορυλιωμένο κατάλοιπο της Σερίνης 9 συνδέεται στην αρχική θέση δέσμευσης του υποστρώματος.

**C)** Το υπόστρωμα συνδέεται στην αρχική θέση δέσμευσης του υποστρώματος και στη συνέχεια η GSK3 τοποθετεί 4 N-κατάλοιπα σερίνης/θερονίνης στην περιοχή της κινάσης έτσι ώστε να διευκολυνθεί η φωσφορυλίωση του υποστρώματος.

**D)** Η φωσφορυλιωμένη σερίνη αναστέλλει την πρόσδεση του υποστρώματος στην αρχική του θέση κι έτσι το υπόστρωμα απομακρύνεται.

Τα υποστρώματα συχνά περιέχουν τρία ή τέσσερα γειτονικά ευπροσάρμοστα μοτίβα S/T-X-X-X/S (P), επιτρέποντας στην GSK3 να φωσφορυλιώνει κάθε τέταρτο κατάλοιπο σε μια σειρά διαδοχικών θέσεων, καθώς δημιουργεί τη δική της αρχική θέση πρόσδεσης του υποστρώματος σταδιακά. Για παράδειγμα, η GSK3

φωσφορυλιώνει τις σερίνες 652, 648, 644 και 640 σε συνθήκη γλυκογόνου και τα κατάλοιπα 41, 37 και 33 σε β-κατενίνη. Σε μερικές περιπτώσεις, μη ενεργοποιημένα υποστρώματα μπορεί να περιέχουν ένα όξινο κατάλοιπο τεσσάρων καρβόξυ-τελικών αμινοξέων από την θέση στόχου GSK3 στη θέση του φωσφορυλιωμένου καταλοίπου, έτσι ώστε το όξινο κατάλοιπο να μπορεί να αλληλεπιδρά με την θέση πρόσδεσης του αρχικού υποστρώματος, αλλά αυτό δεν συμβαίνει πάντα. Η συχνή απαίτηση για ένα αρχικό υπόστρωμα είναι εξαρτημένη από δύο μηχανισμούς που ρυθμίζουν τις δράσεις της GSK3, την ανασταλτική φωσφορυλίωση της σερίνης της GSK3 και τον έλεγχο της διαθεσιμότητας του υποστρώματος, ένα θέμα το οποίο αναλύεται στο επόμενο υποκεφάλαιο. Η φωσφορυλίωση της σερίνης 21 από την GSK3a και της σερίνης 9 στην GSK3b ωθεί το N-τελικό άκρο της αμινοξικής ουράς της GSK3 να δρα ως προ-φωσφορυλιωμένο υπόστρωμα ή ψευδοϋπόστρωμα (Frame et al., 2001). Αυτή η φωσφορυλιωμένη αμινοξική ουρά σερίνης δεσμεύεται αυτόνομα στην αρχική θέση πρόσδεσης του υποστρώματος και εμποδίζει την φωσφορυλίωση του εισερχόμενου υποστρώματος από την GSK3.

Διάφορες οδοί σηματοδότησης τροφοδοτούν αυτόν τον μηχανισμό όπως η Akt, η πρωτεϊνική κινάση A (PKA), η πρωτεϊνική κινάση C PKC, η p70, η κινάση S6 καθώς και άλλες κινάσες. Με αυτόν τον τρόπο, διάφορες αλληλουχίες σηματοδότησης που ενεργοποιούν αυτές τις κινάσες μπορούν να αναστείλουν την δράση της GSK3 φωσφορυλιώνοντας αυτές τις ανασταλτικές κινάσες.

Μια ενδιαφέρουσα εξαίρεση σε αυτόν τον ρυθμιστικό μηχανισμό είναι η πρόσφατη ανακάλυψη ότι η GSK3 φωσφορυλιώνει την AMP-ενεργοποιημένη κινάση (AMPK) για να αναστείλει τη δράση της (Suzuki et al., 2013).

Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι η Akt, η οποία συνήθως αναστέλλει την GSK3 με φωσφορυλίωση σερίνης 9 και 21, προάγει τη φωσφορυλίωση της AMPK από την GSK3, δείχνοντας ότι σε ορισμένες περιπτώσεις οι Akt και GSK3 διαμορφώνουν παρόμοια μονοπάτια σηματοδότησης. Ωστόσο, γενικά, η μέτρηση της φωσφορυλίωσης της GSK3 σερίνης-9/21 παρέχει μια πολύτιμη εκτίμηση των συνθηκών που ρυθμίζουν τη δραστηριότητα της GSK3 μέσω αυτού του μηχανισμού, αλλά είναι χρήσιμο να εξεταστούν τέσσερα στοιχεία για την εξαγωγή αυτού του συμπεράσματος:

- Δεν είναι όλα τα υποστρώματα αρχικοποιημένα επομένως τα μη αρχικοποιημένα υποστρώματα μπορεί να μην απαιτούν την ειδική πρόσδεση με την αρχική θέσης πρόσδεσης της κινάσης GSK3 για να φωσφορυλιωθούν από αυτήν.

Αυτό θα εξαρτηθεί από την ύπαρξη όξινου αμινοξικού καταλοίπου στην περιοχή του αρχικού καταλοίπου. Επομένως, ο μηχανισμός αναστολής της φωσφορυλίωσης της σερίνης δεν ρυθμίζει αναγκαστικά τη φωσφορυλίωση των μη αρχικοποιημένων υποστρώματων από την GSK3. Συνεπώς, αν υποβληθεί σε έρευνα ένα υπόστρωμα που δεν είναι αρχικοποιημένο, η εξέταση των αλλαγών στη φωσφορυλίωση της σερίνης από την GSK3 θα πρέπει να ερμηνεύεται προσεκτικά. Έτσι, είναι σημαντικό να κατανοηθούν τα χαρακτηριστικά των υποστρώματων για την GSK3 όταν διερευνώνται οι ρυθμιστικές αλληλεπιδράσεις τους με την GSK3.

- Η δραστικότητα της GSK3 σε ορισμένα συμπλέγματα πρωτεϊνών δεν επηρεάζεται από την φωσφορυλίωση της σερίνης από την GSK3. Αυτό έχει γίνει πιο καλά εδραιωμένο αλλά συχνά παρερμηνεύεται όταν πρόκειται για Wnt σηματοδότηση, η οποία είναι αδιαπέραστο από την φωσφορυλίωση της σερίνης από την GSK3 που συνδέεται με την Axin.

- Η δράση της φωσφορυλίωσης της σερίνης της GSK3 συχνά υφίσταται αλλαγές στον ρυθμό. Έτσι, η δράση της μπορεί να είναι ταχεία, όπως σε νευρώνες εκπόλωσης-επαναπόλωσης ή βραδύτερη, όπως συμβαίνει σε αλλαγές που σχετίζονται με ποικίλα επίπεδα κυκλοφορούντων ορμονών που ρυθμίζουν την GSK3 ή που σχετίζονται με τον κιρκαδικό ρυθμό στον υπερχιασματικό πυρήνα και στο ήπαρ των ποντικών, καθώς και σε καλλιιεργημένα κύτταρα (Iitaka et al, 2005).

Αυτές οι διακυμάνσεις μπορεί να επηρεάσουν το βασικό επίπεδο φωσφορυλίωσης της GSK3 και της ανταπόκρισής της στις επεμβάσεις ανάλογα με τις χρονικές κλίμακες των διακυμάνσεων και τους πειραματικούς χειρισμούς.

- Ένα από τα πιο συχνά και καλά μελετημένα χαρακτηριστικά του μηχανισμού αναστολής της φωσφορυλίωσης της σερίνης είναι ότι δεν προκαλεί απόλυτη αναστολή της δραστικότητας της GSK3. Αντίθετα, η περιοχή φωσφορυλιωμένης σερίνης 9 και 21 είναι ανασταλτική από έναν μηχανισμό που είναι ανταγωνιστικός με τα αρχικοποιημένα υποστρώματα (Frame et al., 2001). Η αμινοξική ουρά της σερίνης 9 και 21 της GSK3 είναι σε μια δυναμική κατάσταση φωσφορυλίωσης και αποφωσφορυλίωσης και κυμαίνεται στη δέσμευση και απελευθέρωση της από την αρχική θέσης πρόσδεσης για το υπόστρωμα. Έτσι, καθώς η συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος αυξάνεται, είναι σε θέση να ανταγωνίζεται την περιοχή φωσφορυλιωμένης σερίνης 9 και 21 για σύνδεση με την GSK3. Μία παράμετρος αυτού είναι ότι μόνο σε χαμηλές συγκεντρώσεις του αρχικού υποστρώματος η φωσφορυλίωση του από την GSK3 μπλοκάρεται από την δέσμευση

της φωσφορυλιωμένης σερίνης 9 και 21. Καθώς η συγκέντρωση του αρχικού υποστρώματος αυξάνεται, μετατοπίζει την φωσφορυλιωμένη σερίνη 9 και 21 και για άλλη μια φορά μπορεί να φωσφορυλιωθεί από την GSK3. Έτσι, η ανασταλτική φωσφορυλίωση της σερίνης από την GSK3 δεν εξαλείφει απολύτως τη φωσφορυλίωση των αρχικών υποστρωμάτων, αλλά αυτός ο μηχανισμός επιτρέπει τη συσσώρευση του αρχικού υποστρώματος που φθάνει σε ένα νέο επίπεδο σταθερής κατάστασης στην οποία επανέρχεται ως υπόστρωμα της GSK3.

Συνεπώς, υπάρχουν πολλές περιπλοκές που σχετίζονται με τον μηχανισμό φωσφορυλίωσης της σερίνης και την ρύθμιση της GSK3, που μπορεί να οδηγήσουν σε εσφαλμένες ερμηνείες των επιστημονικών ευρημάτων, γι' αυτό και είναι επιτακτική η ανάγκη να παραχθούν σημαντικές ενδείξεις σχετικά με τη ρύθμιση των συστημάτων σηματοδότησης. Η φωσφορυλίωση της σερίνης21-GSK3a και της ser9-GSK3b μπορεί να πραγματοποιείται από μεγάλο αριθμό διαφορετικών κινασών, όπως έχει σημειωθεί παραπάνω. Αυτό είναι σημαντικό τόσο επειδή επιτρέπει πολλές οδούς σηματοδότησης να επηρεάσουν την GSK3, όσο και για την GSK3 η οποία μπορεί να ενεργεί ως «ολοκληρωτής» σημάτων. Φαίνεται πιθανόν, αλλά δεν έχει ακόμη αποδειχθεί με επαρκείς λεπτομέρειες, ότι ο σχηματισμός συμπλεγμάτων πρωτεϊνών κατέχει σημαντικό ρόλο επιτρέποντας πολλαπλά σήματα και τις ιδιαίτερες κινάσες αυτών να ρυθμίζουν την δράση της GSK3.

Είναι επίσης ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι αυτές δεν είναι αλληλεπιδράσεις μονής κατεύθυνσης, αλλά ότι η δραστηριότητα της GSK3 μπορεί επίσης να ρυθμίσει τις δράσεις κάποιων κινασών που αναστέλλουν την GSK3.

Αυτή η αμφίδρομη σχέση έχει μελετηθεί περισσότερο σε συνδυασμό με την Akt, όπου δεν αναστέλλει μόνο η Akt την GSK3 αλλά και η GSK3 μπορεί επίσης να ρυθμίσει την δράση της Akt. Για παράδειγμα, η GSK3 μπορεί να ρυθμίσει την δράση της Akt σε ένα σύμπλεγμα με β-αρρεστίνη. Η GSK3a έχει επίσης αποδειχθεί ότι ρυθμίζει την δράση Akt κατά τρόπο πιο αποτελεσματικό σε σχέση την GSK3b, καθώς έχει αναφερθεί ότι η GSK3a προάγει την ενεργοποιητική φωσφορυλίωση της Akt, η οποία μπορεί να είναι μηχανισμός εξειδικευμένων κυττάρων για την GSK3a με σκοπό να μετριαστούν οι δικές της δράσεις (Lu et al. 2011). Επιπροσθέτως, η GSK3a μπορεί επίσης να αναστείλει τη δραστηριότητα της Akt μέσω φωσφορυλίωσης σε πρόσφατα ανακαλυφθείσα ρυθμιστική θέση θρεονίνης312-Akt (Gulen et al, 2012).

Επίσης, η GSK3 ενεργοποιεί τη δραστηριότητα πρωτεϊνικής φωσφατάσης-1 (PP1) με φωσφορυλίωση για να αναστείλει τον αναστολέα της ο οποίος ονομάζεται I-2.

Αυτή η ενεργοποίηση της PP1 όχι μόνο αυξάνει την δραστικότητα της GSK3, αλλά μπορεί επίσης να αποφωσφορυλιώνει άλλες κινάσες, μειώνοντας έτσι την επαγωγή της φωσφοσερίνης-GSK3 (DePaoli-Roach, 1984, Zhang et al, 2003). Έτσι, υπάρχουν σαφώς αμφίδρομες αλληλεπιδράσεις μεταξύ της GSK3 και των κινάσων που φωσφορυλιώνουν την GSK3, οι οποίες πιθανόν οδηγούνται από συγκεκριμένες οδούς σηματοδότησης σε εξειδικευμένους τύπους κυττάρων και υπάρχουν μηχανισμοί με τους οποίους η δραστική GSK3 μπορεί να διαιωνίσει τη δική της δραστηριότητα.

Η GSK3 επίσης φωσφορυλιώνεται σε άλλες θέσεις εκτός από τις σερίνες 9 και 21, αλλά τα ρυθμιστικά αποτελέσματα τους παραμένουν ασαφής. Η φωσφορυλίωση σε θέσεις τυροσίνης 216 για την GSK3b και Τυροσίνης 279 για την GSK3a απαιτείται για την μέγιστη δραστικότητά της. (Hughes et al, 1993, Frame and Cohen, 2001). Κατά τη διάρκεια της μετάφρασης, η GSK3 φωσφορυλιώνεται σε αυτά τα υπολείμματα έτσι ώστε να συντίθεται άμεσα μια δραστική κινάση (Cole et al., 2004b). Αυτό είναι ένα άλλο συναρπαστικό χαρακτηριστικό της GSK3 διότι κατά τη διάρκεια της σύνθεσής της μπορεί να είναι μια κινάση τυροσίνης, αλλά η ώριμη GSK3 είναι μια κινάση σερίνης/θρεονίνης. Αν και εξακολουθεί να είναι ασταθείς, φαίνεται ότι οι φωσφατάσες φωσφοτυροσίνης μπορούν να απενεργοποιήσουν την GSK3 υπό ορισμένες συνθήκες, επειδή έχουν αναφερθεί αλλαγές στα επίπεδα φωσφοτυροσίνης-GSK3 σε μια ευρεία ποικιλία συνθηκών.

Ωστόσο, απαιτείται περισσότερη έρευνα για να διευκρινιστεί πώς και πότε η GSK3 ρυθμίζεται από μεταβολές στη φωσφορυλίωση της τυροσίνης.

Η GSK3b επίσης φωσφορυλιώνεται σε θέσεις σερίνης 389, 390 και 43, αλλά λίγα είναι γνωστά για συγκεκριμένες οδούς σηματοδότησης που μεσολαβούν σε αυτές τις τροποποιήσεις και που οδηγούν τα λειτουργικά αποτελέσματά τους. Η επιστημονική κοινότητα υποθέτει εδώ και καιρό ότι η GSK3 μάλλον ρυθμίζεται από επιπρόσθετους μετα-μεταφραστικούς μηχανισμούς επειδή φαίνεται ότι απαιτείται περισσότερος έλεγχος για να γίνει διάκριση μεταξύ πολυάριθμων υποστρωμάτων ειδικών για αυτήν αλλά και να ρυθμίζεται εξειδικευμένα από ειδικές οδούς σηματοδότησης (Jope and Johnson, 2004). Τέτοιες τροποποιήσεις αρχίζουν τελικά να εντοπίζονται. Έχει αναφερθεί ότι η GSK3 έχει διασπαστεί σε ενεργοποιημένα θραύσματα με καλπαΐνη (Goñi-Oliver et al., 2007, Goñi-Oliver et al., 2009) και με μεταλλοπρωτεϊνάση-2 (Kandasamy and Schulz, 2009) στα υποστρώματα προς φωσφορυλίωση.

Τέλος, έχει αναφερθεί πρόσφατα ρυθμιστική επίδραση της ακετυλίωσης στη δραστικότητα της GSK3 (Monteserin-Garcia et al., 2013). Επιπλέον, η GSK3b βρέθηκε πρόσφατα να αναστέλλεται από την μονο-ADP-ριβοζυλίωση (Feijs et al., 2013, Rosenthal et al., 2013) και να ρυθμίζεται από την κιτρουλίωση (Stadler et al., 2013). Αυτοί και άλλοι, ανεξάρτητοι από τη φωσφορυλίωση, μετα-μεταφραστικοί μηχανισμοί φαίνεται να συμβάλλουν στη ρύθμιση των πολλαπλών δράσεων της GSK3. Στο εγγύς μέλλον προβλέπεται ότι θα σημειωθεί σημαντική πρόοδος στον προσδιορισμό συγκεκριμένων οδών που χρησιμοποιεί καθεμία από αυτές τις τροποποιήσεις και την αναγνώριση πρόσθετων μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων που ρυθμίζουν την δράση της GSK3.

#### **1.2.4.2 Φωσφορυλίωση υποστρώματος και βιοδιαθεσιμότητα**

Η αναγνώριση και εν τέλει σύνδεση του υποστρώματος στην GSK3 είναι ένας συχνά υποτιμημένος αλλά κρίσιμος μηχανισμός για τη ρύθμιση των δράσεων και της αποτελεσματικότητας της GSK3. Δύο είναι τα σήματα που πρέπει να συμπίπτουν χρονικά και χωρικά έτσι ώστε η GSK3 να φωσφορυλιώσει την πλειονότητα των υποστρωμάτων της: το σήμα της διέγερσης της πρωτεύουσας φωσφορυλίωσης του υποστρώματος και το σήμα της ενεργοποίησης της GSK3. Όπως έχει ήδη αναφερθεί στο προηγούμενο υποκεφάλαιο, τα περισσότερα υποστρώματα ειδικά για την GSK3 πρέπει να προετοιμαστούν με φωσφορυλίωση σε περίπου τέσσερα C-τελικά κατάλοιπα προς τον στόχο της αλληλουχίας S/T-X-X-X-δ/T (P) της GSK3.

Αυτό σημαίνει ότι η GSK3 δεν αναγνωρίζει το υπόστρωμα εκτός εάν ενεργοποιηθεί άλλη οδός σηματοδότησης η οποία αρχίζει με προ-φωσφορυλιωμένο υπόστρωμα. Αυτός είναι ένας εξαιρετος μηχανισμός για τον περιορισμό της δράσης της GSK3 διότι πρέπει να δημιουργηθούν σήματα για την ενεργοποίηση μιας κινάσης που προ-φωσφορυλιώνει το υπόστρωμα, η GSK3 πρέπει να συνεντοπιστεί με το αρχικό υπόστρωμα και τέλος ο χρονισμός των σημάτων που ενεργοποιούν την GSK3 (π.χ. αποφωσφορυλίωση φωσφοσερίνης) πρέπει να συντονιστούν ώστε να προσδιοριστεί εάν και πότε η GSK3 θα φωσφορυλιώσει το υπόστρωμα. Αυτό παρέχει έναν κομψό μηχανισμό για την αποτροπή των παράπλευρων ενεργειών της GSK3 και τον περιορισμό του χρόνου ζωής των αρχικοποιημένων υποστρωμάτων. Για παράδειγμα, η πρωτεΐνη δέσμευσης για τον παράγοντα απόκρισης μεταγραφικού παράγοντα του κυκλικού AMP (CREB) δεν αναγνωρίζεται από την GSK3 εκτός εάν ενεργοποιηθεί

μια οδός ενεργοποίησης του CREB η οποία επάγει τη φωσφορυλίωση του CREB σε θέση σερίνης 133, και εν τέλει ενεργοποιεί τον CREB. Το γεγονός αυτό δημιουργεί μια θέση επαγόμενης φωσφορυλίωσης για την GSK3, και με αυτόν τον τρόπο οι ενδοκυτταρικές οδοί σηματοδότησης κατευθύνουν την GSK3 προς τον στόχο της.

Ωστόσο, δεδομένου ότι η GSK3 είναι μερικώς φωσφορυλιωμένη σε μια θέση σερίνης και επομένως μερικώς αναστέλλεται από την αναγνώριση των προετοιμασμένων αρχικοποιημένων υποστρωμάτων, απαιτείται ένα άλλο σήμα που συμπίπτει χρονικά αλλά και μια ενδοκυτταρική θέση για να μειώσει τη φωσφορυλίωση της σερίνης της GSK3 και να της επιτρέψει να αναγνωρίσει τη φωσφοσερίνη133-CREB. Με άλλα λόγια, για την ενεργοποίηση του πυρηνικού CREB, ένα σήμα πρέπει να προκαλέσει αποφωσφορυλίωση σερίνης της GSK3 στον πυρήνα σε μια περιοχή που ο CREB φωσφορυλιώνεται σε θέση σερίνης-133. Δεδομένου ότι η φωσφορυλίωση του CREB σε θέση σερίνης-129 από την GSK3 απενεργοποιεί τον CREB, αυτό το γεγονός αντιμετωπίζεται ως μηχανισμός για να διασφαλιστεί ότι η ενεργοποίηση του CREB είναι παροδική, αποτέλεσμα που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε παροδικά γεγονότα που απαιτούν ενεργό CREB για μικρό χρονικό διάστημα. Έτσι, αυτό παρέχει έναν εξάισιο μηχανισμό για την πορεία των δράσεων των υποστρωμάτων GSK3.

## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### **ΡΟΛΟΣ GSK3a/b ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΚΑΡΚΙΝΟΥ**

#### **2.1 Διαφορική δράση και ρύθμιση GSK3a και GSK3b**

Ένα σημαντικό θέμα είναι η αναγνώριση των διαφορών στη ρύθμιση και τη δράση των GSK3a και GSK3b. Οι περιοχές κατάλυσης των δύο πρωτεϊνών είναι σχεδόν πανομοιότυπες, ωστόσο οι αλληλουχίες με καρβοξυτελικό-άκρο διαφέρουν και η GSK3a περιέχει μία μεγάλη περιοχή αποτελούμενη από γλυκίνη με αμινοτελικά-άκρα. Αυτή η περιοχή απουσιάζει από την GSK3b (Kaidanovich-Beilin and Woodgett, 2011). Παρόλο που βιβλιογραφικά καλούνται ισομορφές, οι GSK3a και GSK3b είναι ομόλογες πρωτεΐνες που προέρχονται από διαφορετικά γονίδια. Λίγα είναι γνωστά για τους μηχανισμούς που διαφέρουν όσον αφορά στη ρύθμιση των εκφράσεών τους, εκτός της νέας ανακάλυψης ότι το γονίδιο της GSK3b απουσιάζει



στα πτηνά (Alon et al., 2011). Καταγεγραμμένες διαφορές στην έκφραση περιλαμβάνουν την κατ' επιλογήν θετική ρύθμιση της έκφρασης της GSK3b στον υπότυπο Th17 των T-κυττάρων, ο οποίος είναι παθολογικός σε αυτοάνοσες παθήσεις (Beurel et al., 2011; Beurel et al., 2013), και διαφορές στην έκφραση των GSK3a και GSK3b στις εγκεφαλικές περιοχές ποντικών κατά την ανάπτυξη αυτών (Beurel et al., 2012) και στον υπερχιασματικό πυρήνα κατά τη διάρκεια του κικκάδιου ρυθμού (Iwahana et al., 2004). Μελέτες των μηχανισμών που διαφέρουν στη ρύθμιση της έκφρασης των GSK3a και GSK3b είναι αναγκαίες για την αναγνώριση σημάτων που ελέγχουν την έκφραση κάθε ισομορφής.

Για πολλά χρόνια, οι GSK3a και GSK3b συχνά θεωρούνταν σαν «δίδυμα», εν μέρει επειδή όλοι οι γνωστοί αναστολείς της GSK3 ανάστέλλαν και τις δύο ισομορφές οπότε και ήταν δύσκολη η αναγνώριση διαφορετικών επιδράσεων στις δύο ισομορφές. Δυστυχώς, ένας μεγάλος αριθμός μελετών κατέγραψαν αποτελέσματα θεραπειών με αναστολείς GSK3 ειδικά για την GSK3b, κάτι που οδήγησε σε λανθασμένα συμπεράσματα πως η GSK3b επιλεκτικά υποβοηθούσε τις υπό μελέτη διαδικασίες. Επίσης, υπήρχε μία γενική αντίληψη ότι συγκεκριμένοι, εμπορικά διαθέσιμοι, αναστολείς GSK3 ήταν ειδικοί μόνο για μία ισομορφή, κάτι που προέκυπτε από το γεγονός ότι η ανασυνδυασμένη GSK3b χρησιμοποιούνταν συχνά για την αναγνώριση πιθανών αναστολέων. Ωστόσο, δεν υπάρχει εμπορικά διαθέσιμος αναστολέας GSK3 μόνο για μία εκ των ισομορφών (Lo Monte et al., 2012).

Πρόσφατα άρχισαν να αναγνωρίζονται διαφορετικές δράσεις από τις GSK3 ισομορφές κυρίως εξαιτίας των μεθόδων αδρανοποίησης (knockout και knockdown) που χρησιμοποιήθηκαν ευρέως. Η αναγνώριση ξεχωριστών δράσεων από τις δύο ισομορφές ενισχύθηκε από το εύρημα ότι τα ποντίκια με αδρανοποιημένη την GSK3b ήταν “embryonic lethal”, ενώ τα GSK3a knockout ποντίκια μπορούσαν να επιβιώσουν, κάτι που ανέδειξε ότι οι δύο ισομορφές δεν διασυνδέονται (Hoeftlich et al., 2000). Μελέτες σε GSK3b +/- ετερόζυγα ποντίκια και με μερική καταστολή της έκφρασης της GSK3b στον εγκέφαλο των ποντικών, έδειξαν λειτουργίες που ρυθμίζονται από την κάθε ισομορφή (Beaulieu et al., 2004; O'Brien et al., 2004; Beaulieu et al., 2008b; Bersudsky et al., 2008; Kaidanovich-Beilin et al., 2009; Omata et al., 2011; Maurin et al., 2013).

Ωστόσο, στις περισσότερες των περιπτώσεων αυτή η προσέγγιση δεν αποδεικνύει δράσεις που να είναι ειδικές για την κάθε ισομορφή, καθώς δεν ήταν ξεκάθαρο εάν τα αποτελέσματα από την μειωμένη ισομορφή οφείλονταν σε χαμηλότερα συνολικά

επίπεδα της GSK3 ή σε ειδικές δράσεις της ισομορφής εκτός κι αν συγκρίνονταν τα συμπεράσματα τόσο από GSK3a όσο και από GSK3b ποντίκια. Παρόλο που πολλά υποστρώματα φαίνεται να φωσφορυλιώνονται και από τις δύο ισομορφές της GSK3 υπάρχει μία συνεχώς αυξανόμενη αναγνώριση από την επιστημονική κοινότητα ότι συγκεκριμένα υποστρώματα είναι περισσότερο συνδεδεμένα με μία εκ των ισομορφών και πως οι δύο ισομορφές διαφέρουν σε συγκεκριμένες ρυθμιστικές λειτουργίες. Παραδείγματος χάριν, μερικά από τα υποστρώματα που φέρονται να φωσφορυλιώνονται από τις GSK3a και GSK3b περιλαμβάνουν αναστολείς-2, έναν ρυθμιστή PP1 (Wang et al., 1994), την p62 νουκλεοπορινική πρωτεΐνη (Miller et al., 1999), τους μεταγραφικούς παράγοντες πρώιμης αναπτυξιακής απόκρισης-1 & Smad 3/4 (Liang and Chuang, 2006), και υποστρώματα στον φλοιώδη ιστό του εγκεφάλου (Soutar et al., 2010).

Διάφορες δράσεις έχουν αποδοθεί στην GSK3a, συμπεριλαμβανομένων: συμμετοχή στην οξεία μυελογενή λευχαιμία (Banerji et al., 2012), σύνδεση με την πρωτεΐνη του υποδοχέα για την ενεργοποιημένη C-κινάση-1 σαν τμήμα της ρύθμισης που κάνει στον κερκάδιο ρυθμό (Zeidner et al., 2011), προαγωγή του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου και του σχηματισμού πλακών στους ηλικωμένους στην νόσο Αλτσχάιμερ (Phiel et al., 2003; Hurtado et al., 2012; Ly et al., 2013), ρύθμιση της αυτοφαγίας και παθολογιών που σχετίζονται με την ηλικία (Zhou et al., 2013), επιλεκτική ρύθμιση των Th17 κυττάρων μέσω των ιντερλευκινών IL-1, μία δράση που αποδόθηκε στην αναστολή της GSK3a από την ενεργοποίηση των Akt & mTOR πρωτεϊνών από την IL-1 (Gulen et al., 2012). Η GSK3b επιλεκτικά προωθεί την ενεργοποίηση μελών της οικογένειας πρωτεϊνών STAT ως μεταγραφικοί παράγοντες (Beurel and Jope, 2008). Επίσης, επιλεκτικά φωσφορυλιώνει την Mcl-1, η οποία προάγει τη μείωσή της κατά τη σηματοδότηση της απόπτωσης (Ding et al., 2007). Ο έλεγχος εμπλεκόμενων πρωτεϊνών αναγνώρισε αρκετές διαφορές μεταξύ των GSK3a και GSK3b (Pilot-Storck et al., 2010), κάτι που πρέπει να αποτελέσει οδηγό για νεότερες μελέτες σχετικά με τις διαφορετικές τους δράσεις. Μετρήσεις LTP (Long Term Potentiation – Μακροπρόθεσμης ενίσχυσης) και LTD (Long Term Depression – Μακροπρόθεσμη Καταστολή) έδωσαν αποδείξεις για τις διαφορετικές δράσεις των δύο ισομορφών σε επίπεδο συνάψεων. Το 2007, η αναστολή της GSK3 από φωσφορυλιώσεις σερινών φάνηκε πως ήταν αναγκαία για το LTP ενώ η GSK3 προάγει την LTD (Hooper et al., 2007; Peineau et al., 2007; Zhu et al., 2007). Το LTP επηρεάστηκε σε ποντίκια που υπερέκφραζαν την GSK3b (Hooper et al., 2007) και σε ποντίκια που εξέφραζαν

μεταλλαγμένη GSK3b ήταν αδύνατο να ανασταλεί με φωσφορυλίωση σερίνης (Dewachter et al., 2009), και η GSK3b συσχετίστηκε με υποδοχείς που φαίνεται αν είναι σημαντικοί για το LTP (Peineau et al., 2007).

Όλα αυτά κατέδειξαν ότι η GSK3b είναι ένας σημαντικός ρυθμιστής σε συναπτικό επίπεδο ενώ ο ρυθμιστικός ρόλος της GSK3a δεν μελετήθηκε διεξοδικά. Εν αντιθέσει, η χρήση ποντικών που εξέφραζαν μεταλλαγμένη GSK3a ή ποντικών που είχαν έλλειψη GSK3a κατέδειξε ειδικές δράσεις της GSK3a που είναι σημαντικές για τη ρύθμιση σε επίπεδο σύναψης (Maurin et al., 2013; Shahab et al., 2014). Έτσι, ενώ είναι ξεκάθαρο το γεγονός ότι η GSK3 προκαλεί ζημιά στο LTP και προάγει το LTD, το οποίο έχει συσχετιστεί με κατεστραμμένη γνωστική δυσλειτουργία σε διάφορες παθήσεις (King et al., 2014), περαιτέρω προσεγγίσεις απαιτούνται για τη διαλεύκανση των ρόλων που έχει η κάθε ισομορφή σε αυτές τις διαδικασίες. Επιπρόσθετες διαφορετικές δράσεις των δύο ισομορφών στη κυτταρική διαφοροποίηση και ανάπτυξη καθώς και την ανάπτυξη του καρδιαγγειακού συστήματος έχουν επαρκώς καταγραφεί (Force and Woodgett, 2009; Cho et al., 2009; Lal et al., 2012).

Όπως είναι αναμενόμενο, καθώς οι GSK3a και GSK3b έχουν διαφορές όσον αφορά τις λειτουργικές τους επιδράσεις, υπάρχουν επίσης αποδείξεις για διαφορές στους σηματοδοτικούς μηχανισμούς που ρυθμίζουν τις δύο ισομορφές.

Διαφορές στους μηχανισμούς που ρυθμίζουν τους σηματοδοτικούς μηχανισμούς που ρυθμίζουν τις δύο ισομορφές.

Η πρωτεϊνική κινάση C έχει καταγραφεί ότι φωσφορυλιώνει την GSK3b αλλά όχι και την GSK3a (Goode et al., 1992), ενώ η IκB πρωτεΐνη που σχετίζεται με την κινάση-1 φωσφορυλιώνει την GSK3a αλλά όχι και την GSK3b (Gulen et al., 2012). Και οι τρεις ισομορφές της πρωτεΐνης Akt, Akt-1, Akt-2, Akt-3, φωσφορυλιώνουν την GSK3b αλλά μόνο η Akt-2 φωσφορυλιώνει την GSK3a (Brognard et al., 2007).

Η θεραπεία ποντικών με ολανζεπίνη έχει αναφερθεί ότι μείωσε τη φωσφορυλίωση καταλοίπων σερίνης της GSK3a και αύξησε εκείνη της GSK3b (Mondelli et al., 2013). Επιπλέον αναγνώριση των μηχανισμών που ρυθμίζουν διαφορετικά τις GSK3a & GSK3b μπορεί να οδηγήσει προς την ανάπτυξη παρεμβάσεων που μπορούν να επηρεάσουν μία ισομορφή περισσότερο από την άλλη.

## 2.2 Μονοπάτι δράσης GSK3a/b στον καρκίνο

Υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για την GSK3 ως πιθανός θεραπευτικός στόχος για πολλούς τύπους καρκίνου (Manoukian and Woodgett, 2002; Ougolkon and Billadeau, 2006; Mills et al., 2011; McCubrey et al., 2014). Ωστόσο, αυτή η εφαρμογή περιπλέκεται από ευρήματα σχετικά με τη δράση της GSK3 ως ογκοκατασταλτικό ή σαν επαγωγέας της κυτταρικής ανάπτυξης σε διάφορους τύπους καρκίνου. Η δράση ως ογκοκατασταλτικό περιγράφεται από την φωσφορυλίωση που υποβοηθείται από την GSK3 στις β-κατενίνες και τη συνεχή τους μείωση, ενός μεταγραφικού συμπράγοντα που συχνά προάγει την κυτταρική ανάπτυξη (Polakis, 2007).

Υπάρχουν ενδείξεις ότι η GSK3 δρα σαν ογκοκατασταλτικό σε μερικούς καρκίνους του δέρματος (Leis et al., 2002; Ma et al., 2007) και του μαστού (Farago et al., 2005; Armanious et al., 2010; Dembowy et al., 2014) η δε καταστολή της μεταγραφής της RNA-πολυμεράσης-1 από την GSK3 φαίνεται να συμβάλλει στην ογκοκατασταλτική της δράση (Vincent et al., 2008). Αντίθετα, οι όγκοι υπάρχει περίπτωση οι ίδιοι να αυξάνουν την δραστηριότητα της GSK3. Αυτό φαίνεται από τα υψηλά επίπεδα GSK3 σε διάφορους τύπους όγκων και από την αντι-αναπτυξιακή δράση των αναστολέων της GSK3, όπως σε καρκίνους του παχέος εντέρου (Shakoori et al., 2007) και του παγκρέατος (Ougolkon et al., 2005; Garcea et al., 2007) καθώς και σε λευχαιμίες (Wang et al., 2008; Wang et al., 2010), ενώ τα δεδομένα είναι αντικρουόμενα όσον αφορά στον καρκίνο του προστάτη (Mulholland et al., 2006; Darrington et al., 2012). Αυτές οι διαφορές στις δράσεις της GSK3 σε διάφορους τύπους καρκίνου μπορεί να παρεμποδίζονται από την ανάπτυξη αναστολέων GSK3 για τον καρκίνο.

Η εξέταση των μηχανισμών που καταδεικνύουν τις αντίθετες δράσεις των αναστολέων GSK3 σε διάφορους τύπους καρκίνου μπορεί να παρέχει ευκαιρίες για καλύτερη κατανόηση των κυτταρικών αλλαγών και την αναγνώριση αυτών που μπορούν με ασφάλεια ωφεληθούν από τη χορήγηση GSK3 αναστολέων. Μία από αυτές τις διαφορές μπορεί να εξαρτάται από ποιόν μηχανισμό συμμετέχει σε κάθε καρκινικό τύπο. Όπως έχει αναφερθεί (Beurel and Jope, 2006), η GSK3 έχει αντίθετες δράσεις στα ενδογενή κι εξωγενή μονοπάτια σηματοδότησης της απόπτωσης. Η ενδογενής ενεργοποίηση της απόπτωσης, γνωστή κι ως μονοπάτι της μιτοχονδριακής απόπτωσης, προάγεται από την GSK3 (Beurel and Jope, 2006), οπότε εάν αυτό το μονοπάτι καταστραφεί σε διάφορους καρκίνους, οι αναστολείς της GSK3 θα ήταν επιβλαβείς.

Αντίθετα, η εξωγενής σηματοδότηση της απόπτωσης που υποβοηθείται από υποδοχείς-«θανάτου», όπως ο Fas, μπλοκάρονται από ένα αντι-αποπτωτικό πρωτεϊνικό σύμπλεγμα που συμπεριλαμβάνει την GSK3. Στην περίπτωση αυτή οι αναστολείς GSK3 θα μπορούσαν να προάγουν την απόπτωση που υποβοηθείται από τους εν λόγω υποδοχείς (Sun et al., 2008), ένας μηχανισμός που συμβάλει στην νευρωνική και κινητική τοξικότητα που υποβοηθείται από τους αναστολείς της GSK3 (Gomez-Sintes and Lucas, 2010). Οι ποικίλοι ρόλοι της GSK3 σε διάφορους τύπους καρκίνου μπορεί να επίσης να σχετίζεται με διαφορετικές δράσεις του μεταγραφικού παράγοντα NF-κΒ σε μεμονωμένους τύπους καρκίνου. Η GSK3 έχει πολλαπλές ρυθμιστικές αλληλεπιδράσεις με τον NF-κΒ και η GSK3 φωσφορυλιώνει πολλαπλούς παράγοντες του σηματοδοτικού μονοπατιού του NF-κΒ που μπορεί να οδηγήσει σε ρύθμιση, εξαρτώμενη από το περιβάλλον, της GSK3 (Beurel and Jope, 2006).

Έτσι, ο τύπος της απόπτωσης, ο ρόλος των β-κατενινών και οι δράσεις του NF-κΒ είναι πιθανώς σημαντικοί στις δράσεις της GSK3 και των αναστολέων της σε συγκεκριμένους καρκίνους. Η GSK3 φαίνεται να ρυθμίζει διάφορους τύπους καρκίνου αλλά οι μικτές της δράσεις μπορεί να καταστήσουν δύσκολη την ανάπτυξη πιθανών θεραπευτικών παρεμβάσεων

### **2.3 Θεραπεία διαφόρων καρκίνων**

Ο ρόλος της συνθάσης 3-βήτα της γλυκόζης (GSK3b) στον καρκίνο είναι ένα αποδεκτό από την επιστημονική κοινότητα φαινόμενο διότι η ίδια η κινάση δρα ως αρνητικός ρυθμιστής της κυτταρικής ανάπτυξης. Από όλα τα διαφορετικά μονοπάτια που οδηγούν στον καρκίνο είναι ένα από τα πιο σημαντικά. Η οδός σηματοδότησης Wnt εμπλέκεται σε φυσιολογίες ασθενειών όπως η οστεοπόρωση και ο καρκίνος. Επίσης, η παρεμπόδιση της GSK3b από την Akt ρυθμίζει θετικά την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου. Η αυξητική ορμόνη ενεργοποιεί την Akt, η οποία με τη σειρά της αναστέλλει τη δραστηριότητα GSK3b. Αυτό οδηγεί σε αύξηση της κυκλίνης D1 και αναστολή των παραγόντων μεταγραφής της οικογένειας Forkhead και της ογκοκατασταλτικής φυματινής (TSC2) (Liang and Slingerland, 2003). Επιπροσθέτως, η δράση της GSK3b απενεργοποιείται μετά από φωσφορυλίωση όταν διεγείρεται με ιντερλευκίνη 6 (IL-6). Η αναστολή της δραστηριότητας της GSK3b είναι επαρκής για την καταστολή της κυτταρικής ανάπτυξης και την επαγωγή της απόπτωσης,

παρακάμπτοντας έτσι τις επιδράσεις της ιντερλευκίνης 6 (IL-6) σε κύτταρα μυελώματος (Inokiet al., 2006). Η GSK3b επίσης ελέγχει την ογκογονικότητα μέσω των CLL B λεμφοκυττάρων 3 (BCL-3). Η GSK3b φωσφορυλιώνει το BCL-3 και ρυθμίζει την αποικοδόμηση και την ογκογονικότητα του (Viatour et al., 2004). Οι κινάσες ERK1/2 διαδραματίζουν και αυτές σημαντικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Η φωσφορυλίωση της GSK3b εξαρτάται από την ενεργοποίηση των ERK1/2 που επάγεται από το βολφραμικό (Gomez-Ramos et al., 2006).

Παρόλο που μέχρι σήμερα δεν έχει βρεθεί κάποια μετάλλαξη στην GSK3b που μπορεί να σχετίζεται με παθολογολογία κάποιας νόσου, έχουν αναφερθεί μεταλλάξεις σε υποστρώματα (Sagae et al., 1999) της. Παραδείγματος χάριν, μετάλλαξη γονιδίου της β-κατενίνης σε πιθανές θέσεις φωσφορυλίωσης από την GSK3b καταλήγει σε συσσώρευση της πρωτεΐνης β-κατενίνης εντός των κυττάρων και της μετακίνησής της εντός των πυρήνων.

Η συσσωρευμένη πρωτεΐνη β-κατενίνη μπορεί να εμπλέκεται στην ανάπτυξη καρκινωμάτων των ωοθηκών ενδομητριοειδούς τύπου (Ohira et al., 2003). Λόγω της έντονης σημασίας του ρόλου της GSK3b στον καρκίνο και τις πιθανές θεραπευτικές προσεγγίσεις που ενδεχομένως να «αγγίζει», στο επόμενο κεφάλαιο αναλύεται ο ρόλος της σε διάφορους τύπους καρκίνου.

## **2.3.1 Καρκίνος μαστού και προστάτη**

### **2.3.1.1 Καρκίνος του μαστού**

Το ογκογονίδιο για την Ερυθροβλαστική Λευχαιμία (ErbB2) μπορεί να συνεργαστούν με σκοπό τον μετασχηματισμό των επιθηλιακών κυττάρων του μαστού. Η ενεργοποίηση των μονοπατιών MAPK και PI3K μέσω της Akt, παρεμποδίζουν έμμεσα την δράση της GSK3b, οδηγώντας στην παραγωγή περίσσειας σημάτων ErbB (σήματα υπερενεργοποίησης). Αυτά τα σήματα ErbB2 μπορούν να διαμορφώνουν την δραστηριότητα της κυκλίνη D1 και της p27 έτσι ώστε να ρυθμίζουν τη μετάβαση του κυτταρικού κύκλου από φάση G1 σε φάση S που οδηγεί σε μετασχηματισμό και υπερπαραγωγή των επιθηλιακών κυττάρων του μαστού (Lenferink et al., 2001). Η δραστηριότητα της σηματοδότησης Wnt σχετίζεται με την ανάπτυξη και εξέλιξη του καρκίνου του μαστού στον άνθρωπο. Οι Jong et. al το 2006 έδειξαν ότι η σηματοδότηση Wnt εμπλέκεται στην αποδιαφοροποίηση των κυττάρων του όγκου του μαστού και στην παρεμβατική δραστηριότητα του ιστού μέσω μιας εξαρτώμενης από την Axin2 οδού. Η Axin2 ρυθμίζει την μεσεγχυματική μετάπτωση του επιθηλίου (EMT) δρώντας ως κυτταροπλασματική πρωτεΐνη για την GSK3b.

Η GSK3b είναι υπεύθυνη για τον έλεγχο του κύκλου των εργασιών και της δραστηριότητας των snails. Η ταυτοποίηση ενός άξονα β-κατενίνης που ρυθμίζεται από τον Axin2-GSK3b παρέχει νέες γνώσεις για το μηχανισμό δράσης σχετικά με τα προγράμματα EMT που σχετίζονται με τον καρκίνο (Jong et al., 2006). Οι κλινικές ενδείξεις από τους Prasad et al. το 2009 για πρώτη φορά αναφέρθηκαν στην υποστήριξη της σηματοδότησης Wnt/βήτα-κατενίνης στον καρκίνο του μαστού. Αναφέρθηκαν στην θετική ρύθμιση των σημάτων Wnt/βήτα-κατενίνης σε διηθητικά καρκινώματα του πνεύμονα και στα βασικά συστατικά αυτής της οδού (E-cadherin, Slug και GSK3b με βήτα-κατενίνη) στην ανάπτυξη του EMT. Οι μελέτες τους κατέδειξαν σημαντική συσχέτιση μεταξύ του πυρηνικού εντοπισμού της GSK3b και της σταδιοποίησης του όγκου ( $P = 0,02$ ), υποδεικνύοντας τη σύνδεσή του με την πρόοδο του όγκου (Prasad et al. 2009).

### **2.3.1.2 Καρκίνος του προστάτη**

Η διεγερόμενη από τα ανδρογόνα έκφραση γονιδίων σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη εξαρτάται από την δράση της GSK3 (Thiel et al., 2006). Η β-κατενίνη μεσολαβεί στην αλληλεπίδραση μεταξύ των οδών PI3K/Akt και των ανδρογόνων. Οι Liang και Slingerland το 2003 ανέφεραν τους πολλαπλούς ρόλους του PI3K/PK στην πρόοδο και δραστηριότητα του κυτταρικού κύκλου. Η σηματοδότηση μέσω PI3K/Akt επάγει την φωσφορυλίωση και αδρανοποίηση της GSK3b με αποτέλεσμα την αύξηση των πυρηνικών επιπέδων β-κατενίνης. Κατά συνέπεια, η αυξημένη β-κατενίνη αυξάνει τη δράση του υποδοχέα των ανδρογόνων για να διεγείρει την ανάπτυξη και την επιβίωση των καρκινικών κυττάρων του προστάτη (Sharma et al., 2002).

Η καταστολή της GSK3b ευαισθητοποιεί τα καρκινικά κύτταρα του προστάτη στην επαγόμενη από TRAIL απόπτωση η οποία εξαρτάται από τις δραστηριότητες της κασπάσης-8 αλλά είναι ανεξάρτητη από την ενεργοποίηση του παράγοντα NF-kB. Αυτό υποδηλώνει ότι ένας μηχανισμός που εμπλέκει την ενεργοποίηση της GSK3b μπορεί να είναι υπεύθυνος για την αντίσταση από TRAIL σε κύτταρα καρκίνου του προστάτη (Koul et al., 2005).

### **2.3.2 Καρκίνος του παγκρέατος**

Ο καρκίνος του παγκρέατος είναι ένας από τους πιο θανατηφόρους καρκίνους του γαστρεντερικού συστήματος (Devesa et al., 1995). Αυτή η κακή πρόγνωση οφείλεται στην τάση του καρκίνου για καθυστερημένη παρουσίαση, επιθετική τοπική εισβολή, πρώιμες μεταστάσεις και κακή ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία (Duffy et al., 2003). Επιπλέον, οι ασθενείς με προχωρημένο καρκίνο του παγκρέατος υποφέρουν από έντονη καχεξία, που χαρακτηρίζεται από απώλεια μέχρι και 80% του λιπώδους ιστού και των σκελετικών μυών (Tisdale 2002). Αυτή η κυστική αντίδραση έχει ως αποτέλεσμα σημαντική απώλεια της ποιότητας ζωής και βραχύτερη επιβίωση στους ασθενείς για τους οποίους η ανακούφιση είναι και ο στόχος της θεραπείας. Η μόνη θεραπευτική αγωγή για τον καρκίνο του παγκρέατος είναι σήμερα η χειρουργική εκτομή. Αναδρομικές ερευνητικές μελέτες υποδεικνύουν μια παγκόσμια αύξηση του ποσοστού θνησιμότητας από τον καρκίνο του παγκρέατος, αντανakλώντας την αυξανόμενη συχνότητα εμφάνισης παγκρεατικών όγκων (Rohan et al., 1981; Imaizumi et al., 1996; Levi et al., 1998; Lilliemoe et al., 2000). Αυτή η τάση, σε συνδυασμό με την κακή πρόγνωση, τονίζει την ανάγκη να διασαφηνιστούν οι



μηχανισμοί της παγκρεατική καρκινογένεσης, προκειμένου να βρεθούν νέες θεραπείες κατά της νόσου.

Μέχρι στιγμής, υπάρχουν σχετικά λίγα δεδομένα σχετικά με την δράση της GSK3b στον καρκίνο του παγκρέατος. Μελέτες *in vitro* έδειξαν ότι κυτταρικές σειρές από καρκίνο του παγκρέατος έχουν μια δραστική «δεξαμενή» παραγωγής GSK3b και ότι η αναστολή αυτής της κινάσης οδηγεί σε έντονη μείωση της δραστικότητας του παράγοντα NF-κB και μειωμένη έκφραση γονιδίων στόχων όπως και κυκλίνης D1 η οποία εμπλέκεται στον έλεγχο κυτταρικής ανάπτυξης (Ougolkov et al., 2005). Αντανακλώντας αυτές τις παρατηρήσεις στα γονίδια-στόχους, η αναστολή της GSK οδηγεί επίσης σε μειωμένη κυτταρική ανάπτυξη και αυξημένη απόπτωση. Τόσο η αναστολή στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων όσο και η αυξημένη απόπτωση φαίνεται να μην επηρεάζονται από την υπερέκφραση των υπομονάδων NP-κB p65/p50. (Ougolkov et al., 2005).

Ακόμα, έχει αποδειχθεί ότι η GSK3b συσσωρεύεται στους πυρήνες των καρκινικών κυτταρικών σειρών του παγκρέατος και ότι ο βαθμός αυτής της πυρηνικής συσσώρευσης συνδέεται με το βαθμό αποδιαφοροποίησης αυτών των κυττάρων (Ougolkov et al., 2006). Με αυτόν τον τρόπο, η επιστημονική κοινότητα οδηγείται στο συμπέρασμα ότι υπάρχει μεγάλη πιθανότητα η GSK3b να είναι ένας σημαντικός παράγοντας όσον αφορά τον καρκίνο του παγκρέατος, εφόσον μελέτες έδειξαν ότι η αναστολή της δράσης της GSK οδήγησε σε διακοπή της ανάπτυξης του όγκου, αύξηση της απόπτωσης και μείωση των στόχων έκφρασης κάτω από την «επήρεια» του παράγοντα NF-κB όπως και του Bcl-2 (Ougolkov et al., 2006).

Λόγω της υπερενεργοποιημένης σηματοδότησης του NF-κB στον καρκίνο του παγκρέατος, επιστημονικές έρευνες έχουν δείξει ότι η αναστολή αυτής της οδού σηματοδότησης μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη χημειοευαισθησία στις κυτταρικές σειρές του παγκρέατος όσον αφορά παράγοντες πρώτης γραμμής, όπως η γεμισιταβίνη (Arlt et al., 2003). Ως εκ τούτου, η αναστολή της δράσης της GSK3 θα μπορούσε εν γένει να αυξήσει την αναστολή της ανάπτυξης παγκρεατικών καρκινικών κυττάρων από τη γεμισιταβίνη.

Ωστόσο, έρευνες που πραγματοποιήθηκαν σε άλλες κυτταρικές σειρές καρκινικών κυττάρων έχουν δείξει ότι η θεραπεία με λίθιο (αναστολέας της GSK3) παρέχει αντίσταση σε αντικαρκινική θεραπεία (Beurel et al., 2004). Συνεπώς, η επίδραση της

αναστολής της δράσης της GSK3 στην χημειοαντίσταση στον καρκίνο του παγκρέατος χρειάζεται περαιτέρω έρευνα και αξιολόγηση. Ενώ ερευνητές έχουν δείξει ότι η GSK3b δρα απομακρυσμένα από το σύμπλεγμα του IKK σε παγκρεατικά καρκινικά κύτταρα, απαιτείται λεπτομερέστερη κατανόηση αυτού του μηχανισμού (Ougolkon et al., 2005). Πιο συγκεκριμένα, απαιτούνται πληροφορίες σχετικά με το εάν η GSK3b δρα μέσω φωσφορυλίωσης των υπομονάδων p65 ή p50.

Επιπλέον, η επίδραση της GSK3b στη δέσμευση της p65 στα γονίδια-στόχους απαιτεί διερεύνηση. Αυτοί οι ερευνητές που προαναφέρθηκαν (Ougolkon et al., 2006), κατέδειξαν μέσα από τα πειραματικά τους δεδομένα ότι η πυρηνική συσσώρευση της GSK3b εμφανίστηκε σε κυτταρικές σειρές παγκρεατικού καρκίνου, γεγονός που εντείνει και υπογραμμίζει το συμπέρασμα ότι η GSK3b μπορεί να εμπλέκεται στη δέσμευση της p65 ενώ η δράση της μπορεί να ασκείται και σε γονίδια-στόχους. Αμέσως μετά την πυρηνική συσσώρευση, είναι εξίσου εφικτό η GSK να ασκεί την δράση της σε άλλα γονίδια-στόχους, ανεξάρτητα από την οδό σηματοδότησης NF-κΒ, και να εμπλέκεται στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Είναι ευρέως αποδεκτό ότι η GSK3b ρυθμίζει την κυκλοφορία της β-κατενίνης στα κύτταρα, όπως έχει προαναφερθεί σε προηγούμενα κεφάλαια. Συνεπώς, η αναστολή της κινάσης οδηγεί στην αύξηση των επιπέδων της β-κατενίνης στα κύτταρα. Αυτή η σχέση είναι απαραίτητο να προσδιορίζεται λεπτομερέστερα στους παγκρεατικούς καρκίνους.

Πράγματι, οι επιστημονικές μελέτες σε ανθρώπινους ιστούς απέτυχαν να δείξουν συσχέτιση μεταξύ έκφρασης της GSK3b και της παρεκκλίνουσας πυρηνικής β-κατενίνης σε κακοήγη παγκρεατικό ιστό (Al-Aynati et al., 2004).

Επιπλέον, προηγούμενα πειραματικά δεδομένα έδειξαν ότι η ίδια η β-κατενίνη μπορεί επίσης να ρυθμίσει τη δραστηριότητα του NF-κΒ (Deng et al., 2002).

Διάφορα είδη κυτοκινών, όπως οι ιντερλευκίνες και οι TNF-α (tumor necrosis factor alpha), έχειδειχθεί ότι ανατροφοδοτούν και ρυθμίζουν προς τα πάνω ή προς τα κάτω (θετικά ή αρνητικά) τη δραστηριότητα του NF-κΒ στον καρκίνο του παγκρέατος. Η αναστολή της GSK3b είναι αποτελεσματική μόνο στην αναστολή της συστατικής δραστηριότητας του NF-κΒ και δεν απαιτεί περαιτέρω μελέτη.

Ωστόσο, η παρατήρηση ότι η αναστολή της GSK3 επηρεάζει την έκφραση ορισμένων γονιδίων που ενεργοποιούνται σαν απάντηση στη φλεγμονώδη αντίδραση, όπως η ιντερλευκίνη 6 (IL-6) σε μεγαλύτερα επίπεδα από άλλες ιντερλευκίνες, υποδηλώνει ότι η αναστολή της GSK3 μπορεί να μην επηρεάζει εξίσου όλους τους επιβλαβείς στόχους καθοδικά της ενεργοποίησης του μονοπατιού NF-κΒ. Ένας αριθμός αυτών

των στόχων έχουν συνδεθεί με κακή πρόγνωση και ταχεία εξέλιξη του καρκίνου του παγκρέατος, συμπεριλαμβανομένων και της κυκλοξυγενάσης 2 (COX-2), της ιντερλευκίνης 6 (IL-6), της ιντερλευκίνης 8 (IL-8) και του παράγοντα VEGF. Θα πρέπει να διερευνηθεί η επίδραση της αναστολής της GSK3 ενδεχομένως και σε άλλους στόχους.

### **2.3.3 Καρκίνος των πνευμόνων**

Στις περιπτώσεις όγκων των πνευμόνων, η δραστικότητα της GSK3b αναστέλλεται, οδηγώντας στην αύξηση της ελεύθερης β-κατενίνης και στην αύξηση της ρύθμισης της E-καντχερίνης (e-cadherin) στα καρκινικά κύτταρα που τον προκαλούν. Αυτό το φαινόμενο αναφέρθηκε πρώτα από την Ohira et al. το 2003. Τα ευρήματά τους υποστηρίζουν ότι η επαγωγή της E-καντχερίνης μέσω της οδού σηματοδότησης Wnt/b-κατενίνης είναι μια εξελικτικά διατηρημένη οδός όσον αφορά τα καρκινικά κύτταρα των πνευμόνων. Η απώλεια της έκφρασης της WNT7a μπορεί να είναι σημαντική στην ανάπτυξη ή την εξέλιξη του καρκίνου των πνευμόνων τουλάχιστον όσον αφορά τις επιδράσεις της στην E-καντχερίνη (Ohira et al., 2003). Ο πιθανός ρόλος της GSK3b στην πρόκληση καρκίνου του πνεύμονα μελετήθηκε επίσης από τους Tian et al. (2006) οι οποίοι ανέφεραν ότι τα συστατικά του καπνού του τσιγάρου *in vitro* ανέστειλαν σημαντικά την GSK3b.

Η αναστολή της δράσης της GSK3b είτε λόγω του καπνού των τσιγάρων είτε από αναστολείς της GSK3b όπως το λίθιο και το SB216763 ενίσχυσε σημαντικά την έκφραση της involucrin(INV) σε καλλιεργημένα τραχεοβρογχικά επιθηλιακά κύτταρα χοίρου πιθανώς μέσω αρνητικής ρύθμισης της δραστικότητας της AP-1 που οδηγεί σε πλακώδη διαφοροποίηση.

Αυτές οι μελέτες ρίχνουν φως στον πιθανό ρόλο της GSK3b στην πρόκληση καρκίνου του πνεύμονα (Tian et al., 2006).

### **2.3.4 Καρκίνος του παχέος εντέρου**

Σε μια μελέτη για τα καρκινικά κύτταρα του κόλον από τους Shakoori et al το 2005, παρατηρήθηκε ότι η παρεμπόδιση της δραστηριότητας της GSK3b από χημικούς αναστολείς και η έκφρασή της από την επαγόμενη παρέμβαση του RNA δημιουργεί εξασθενημένο πολλαπλασιασμό. Αυτό το φαινόμενο υποδεικνύει ότι υπάρχει ένας ρόλος της GSK3b στην προαγωγή της επιβίωσης και του πολλαπλασιασμού των κυττάρων του όγκου (Shakoori et al 2005) . Παρατηρήθηκε επίσης από άλλους ερευνητές ότι μέσω της αναστολής της GSK3b, η προσταγλανδίνη E2 ώθησε την επαγωγή της μεταγραφής TC-4 στην δημιουργία καρκινικών κυττάρων του κόλον (εξαρτώμενη από β-κατενίνη / TCF) (Liao et al., 2004). Η παρεμπόδιση της GSK-3, ενός ενεργού στόχου της Akt, αναστέλλει πλήρως την πρόσδεση του συνδέτη που επάγει απόπτωση που σχετίζεται με τον TNP (TRAIL) (Wang et al. 2002). Η μελέτη τους κατέδειξε την επαγωγή του TRAIL με αναστολή της PI3-κινάσης σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του παχέος εντέρου. Οι μελέτες άνοιξαν περαιτέρω τον δρόμο για την κατανόηση του ρόλου της οδού PI 3-κινάσης/Akt/GSK-3 στην ομοιόσταση των εντερικών κυττάρων. Το 2008, ο Kang και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι η αναστολή της GSK3b σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα ρυθμίζει την προκαλούμενη από ουβικουϊτίνη πρωτεόλυση του Cdc25A κατά τις πρώτες φάσεις του κυτταρικού κύκλου. Η υπερπαραγωγή του Cdc25A κατά τη φάση G1 του κυτταρικού κύκλου συσχετίζεται έντονα με την απενεργοποίηση της GSK3b. Η οδός PI-3K/Akt ρυθμίζει αρνητικά τόσο την δράση της GSK3b όσο και τη δράση της CHK1 και το γεγονός αυτό με τη σειρά του επάγει την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου αυξάνοντας τα επίπεδα του Cdc25A (Kang et al., 2008).

### **2.3.5 Άλλοι τύποι καρκίνου**

Εκτός από τους τύπους καρκίνων που συζητήθηκαν παραπάνω, η GSK3b αναφέρεται από την βιβλιογραφία επίσης ότι εμπλέκεται στην πρόκληση άλλων καρκίνων όπως ο καρκίνος του στομάχου, το μελάνωμα και το γλοιοβλάστωμα. Αναφέρεται επίσης ότι η αναστολή της GSK3b από το μονοπάτι της Akt οδηγεί σε καρκίνο του στομάχου (Krymsky et al., 2001).

Ο Thiel et al το 2006 επίσης παρατήρησαν ερευνητικά ότι έκφραση πρωτεΐνης 12 PMA επαγόμενη από την έκφραση της κυκλοοξυγενάσης-2 (COX-2), μεσολαβεί μέσω της οδού PKC/PI3K/Akt όπου η δράση της GSK3b είναι ο καθοριστικός ρυθμιστής. Σύμφωνα με αυτούς, αυτός ο τύπος αναστολής GSK3b οδηγεί σε καρκίνο του στομάχου.

Επίσης, η αναστολή της δράσης της GSK3b από την ενεργοποιημένη Akt στο μονοπάτι σηματοδότησης του παράγοντα IGF-1 οδηγεί στη σταθεροποίηση της β-κατενίνης, η οποία με τη σειρά της οδηγεί στο μελάνωμα. Στη συνέχεια, μεταφράζεται η σταθεροποιημένη β-κατενίνη στον πυρήνα και προάγει τη μεταγωγή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού που οδηγεί στο μελάνωμα (Diehl et al, 1998). Το 2008, οι Bellei et al. είχαν αναφέρει την επίδραση της αναστολής της δραστηριότητας της GSK3b στη ρύθμιση της διαφοροποίησης των μελανοκυττάρων. Μελετήθηκαν η επίδραση των ειδικών αναστολέων της GSK3b (SB216763, SB415286, BIO και LiCl) στην κυτταρική σειρά B16 του μελανώματος των ποντικών και στα φυσιολογικά ανθρώπινα μελανοκύτταρα. Παρατηρήθηκε ότι υπάρχει συσσώρευση β-κατενίνης εξαρτώμενη από τη δόση η οποία και οδηγεί στο μελάνωμα. Η μελέτη αυτή επιβεβαιώνει σχεδόν το ρόλο της GSK3b στην ανάπτυξη του μελανώματος.

Τα αποτελέσματα της πειραματικής εργασίας που πραγματοποίησαν οι Welcker et al το 2003 ανέδειξε ότι η παρεμπόδιση της σηματοδοτικής οδού Integrin-linked kinase (ILK)/Akt είναι μια πιθανή στρατηγική για τη μοριακή στοχοθετημένη θεραπεία για τα γλοιώματα. Η ρύθμιση της φωσφορυλίωσης της GSK3b μέσω της Akt σε κύτταρα γλοιοβλαστώματος οδηγεί στον μειωμένο πολλαπλασιασμό των κυττάρων, την εισβολή και την αγγειογένεση.

Ο ρόλος της GSK3b στο γλοιοβλάστωμα επιβεβαιώθηκε περαιτέρω από την πρόσφατη μελέτη σχετικά με το ρόλο του λιθίου στη θεραπεία του γλοιοβλαστώματος (Nowicki et al., 2008).

Αναφέρεται ότι η εξέταση γνωστών στόχων του λιθίου έδειξε ότι η αναστολή της μονοφωσφατάσης της ινοσιτόλης δεν είχε καμία επίδραση στη μετανάστευση του γλοιώματος, ενώ παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη επίδραση στη μετανάστευση του γλοιώματος κατά την αναστολή της δράσης της GSK3b. Σύμφωνα με την συγκεκριμένη έρευνα, οι συγκεκριμένοι φαρμακολογικοί αναστολείς της GSK3b και η κατακράτηση του siRNA της GSK3b μειώνουν την κινητικότητα των κυττάρων. Αυτά τα αποτελέσματα όχι μόνο «ρίχνουν φως» στα προηγουμένως μη αναγνωρισμένα βιοχημικά μονοπάτια που ακολουθούν τα γλοιοβλαστώματα, αλλά

οδηγεί και στην ανάπτυξη αναστολέων για τη θεραπεία του γλοιοβλαστώματος (Nowicki et al., 2008).

Η GSK3b παίζει επίσης, σημαντικό ρόλο ως θετικός ρυθμιστής των ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων των ωοθηκών (Cao et al., 2006). Οι Μελέτες που ενέπλεξαν το ρόλο της GSK3b στον καρκίνο των ωοθηκών έχουν ξεκινήσει από το 1999 (Kim et al., 1999). Η υπερέκφραση της GSK3b στα καρκινικά κύτταρα των ωοθηκών οδήγησε τον Cao και τους συνεργάτες του να μελετήσουν το ρόλο της GSK3b στον καρκίνο των ωοθηκών. Όταν κυτταρικές σειρές με καρκινικά κύτταρα των ωοθηκών υποβλήθηκαν σε αγωγή με αναστολείς της GSK3b, ανέφεραν ότι υπήρξαν σημαντικές μειώσεις στην ανάπτυξη του όγκου. Παρόμοια μείωση στον όγκο και το μέγεθός του παρατηρήθηκε επίσης σε ποντίκια που έχουν το μοντέλο του «ξένου μοσχεύματος» καρκίνου όταν υποβάλλονται σε αγωγή με αναστολέα GSK3b. Παρατηρήθηκε επίσης ότι η αναστολή της δράσης της GSK3b μέσω της διαμεσολαβούμενης από ιντεγκρίνη κινάσης (ILK) στην οδό σηματοδότησης οδηγεί στη σταθεροποίηση και της β-κατενίνης και στη ρύθμιση μεταγραφικών προγραμμάτων που ελέγχουν τον καρκίνο των ωοθηκών (Rosano et al., 2005).

## **2.4 Θεραπεία άλλων ασθενειών**

Πολλές μελέτες και έρευνες που έχουν διεξαχθεί από την επιστημονική κοινότητα έχουν συσχετίσει την δράση και την αναστολή της δράσης της GSK3 με άλλες παθολογίες εκτός του καρκίνου όπως η οστεοπόρωση, η χρόνια υπέρταση κ.α.

### **2.4.1 Οστεοπόρωση**

Αναφέρθηκε σε μελέτες ότι η δεξαμεθαζόνη (DEX) ενεργοποιεί την GSK3b και αναστέλλει έναν κυτταρικό κύκλο που σχετίζεται με τη διαφοροποίηση και εμφανίζεται σε ένα στάδιο δέσμευσης αμέσως μετά τη συρροή. Η αναστολή ενός άξονα που αποτελεί παράγοντα δέσμευσης, του άξονα PI3K/Akt/GSK3b/β-κατενίνης/μεταγραφικού παράγοντα TCF/LEF και η διέγερση της HDAC1 συνεργάζονται για τη μεσολάβηση του ανασταλτικού αποτελέσματος της δεξαμεθαζόνης (DEX) στην οδό σηματοδότησης Wnt και τον κυτταρικό κύκλο που σχετίζεται με τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών (GA et al., 2002). Η οστεοπόρωση, επίσης, αναπτύσσεται λόγω της διατάραξης της ισορροπίας μεταξύ

των λιποκυττάρων και των οστεοβλαστών. Αυτή η ανισορροπία συμβαίνει όταν τα λιποκύτταρα αναπτύσσονται σε βάρος των οστεοβλαστών (Cohen and Frame, 2001). Σε αυτό το πλαίσιο οι Laure και Emmanuelle et al. το 2008 ανέφερε την επίδραση των GSK3b αναστολέων στον έλεγχο των λιποκυττάρων. Οι μελέτες τους κατέδειξαν την δυναμική της GSK3b ως στόχου για τον έλεγχο των λιποκυττάρων και συνεπώς για τον έλεγχο της οστεοπόρωσης (Laure et al., 2008).

#### **2.4.2 Καρδιακή υπερτροφία**

Τα τελευταία χρόνια έχει πραγματοποιηθεί πλήθος αναφορών και μελετών από διάφορους ερευνητές σχετικά με τον πιθανό ρόλο της δράσης της GSK3b στην καρδιακή υπερτροφία. Το 2002, οι Hardt και Sadoshima, και το 2007, οι Kerkela et al. ανέφεραν τον κεντρικό ρόλο της GSK3b στην καρδιακή υπερτροφία. Επίσης, αναφέρθηκε από τους Robertson et al. το 2006 ότι η αναστολή της δράσης της GSK3b με β-αδρενεργική διέγερση καταργεί την επαγόμενη από την GSK3b πυρηνική εξαγωγή της πρωτεΐνης σύνδεσης GATA (GATA4). Αυτό το φαινόμενο μπορεί να αντιπροσωπεύει έναν σημαντικό μηχανισμό σηματοδότησης της GSK3b που μεσολαβεί στην καρδιακή υπερτροφία. Αν και η συμμετοχή της GSK3b στην καρδιακή υπερτροφία είχε αρχικά αναφερθεί το 2001 από τους Morisco et al., Μέχρι πρόσφατα υπάρχει πολύ λιγότερη σαφήνεια του μηχανισμού με τον οποίο η GSK3b παίζει ρόλο στην καρδιακή λειτουργία. Οι Sugden το 2008 ανέλυσαν διεξοδικά τον πιθανό ρόλο της GSK3b στην καρδιακή λειτουργία.

Ωστόσο, λόγω των διαφόρων αντιφατικών αναφορών, συνάγεται το συμπέρασμα ότι εξακολουθεί να είναι ερωτηματικό αν η ενεργοποίηση της δράσης της GSK3b θα οδηγούσε σε θεραπευτικά αποδεκτό μόριο για τη θεραπεία της καρδιακής υπερτροφίας (Sugden et al., 2008). Μια τελευταία έκθεση-μελέτη από την ομάδα του Sadoshima το 2008 έδειξε ότι η διατήρηση της μη φωσφορυλιωμένης S9 της GSK3b σε ποντίκια εμποδίζει την καρδιακή ανεπάρκεια στην καρδιακή υπερτροφία και λειτουργεί κατά τη διάρκεια της υπερφόρτωσης της πίεσης (Matsuda et al., 2008). Αυτές οι αναφορές επιβεβαιώνουν περαιτέρω τον ρόλο της GSK3b στην καρδιακή υπερτροφία.

Μέσα από αυτές τις μελέτες παρατηρείται ότι για να έχουμε έναν αποτελεσματικό διαμορφωτή είναι σημαντικό να έχουμε εκλεκτικότητα των ισομορφών.

### 2.4.3 Υπέρταση

Ο ρόλος της GSK3b στην πρόκληση υπέρτασης σε ζωικά μοντέλα έχει αναφερθεί από έρευνες που έχουν εκπονηθεί στην επιστημονική κοινότητα. Σε υπερτασικούς αρουραίους, η αυξημένη δραστηριότητα της GSK3b αυξάνει ελαφρώς τις επιδράσεις του PI3K αλλά δεν φαίνεται να συνεισφέρει σημαντικά στην αλλοιωμένη αρτηριακή αντιδραστικότητα στην υπέρταση του δεσοξυκορτικοστερόνης-αλατιού (Loberg et al., 2003). Η μεσολαβούμενη από την GSK3b ρύθμιση της διαμόρφωσης της μιτοχονδριακής διαπερατότητας στην ισχαιμική καρδιά επανεμφανίστηκε και αναφέρθηκε από τους Mozaffari και Schaffer το 2008. Διαπίστωσαν ότι η θεραπεία με τους αναστολείς GSK3b, LiCl και SB-216763 μείωσε την πιθανότητα εμφάνισης εμφράγματος και στις δύο πιέσεις, με πιο έντονο αποτέλεσμα στην υψηλότερη πίεση διάχυσης. Η μελέτη αυτή υπογράμμισε το ρόλο της GSK3b στον έλεγχο της υπέρτασης. Ωστόσο, απαιτούνται περισσότερες μελέτες για να επικυρωθεί αυτό ως στόχος στον χώρο ανακάλυψης φαρμάκων.

### 2.5 Η GSK3 στην κλινική πράξη

Οι δημοσιευμένες πατέντες για αναστολείς GSK3b αυξάνονται με γεωμετρική πρόοδο. Η πλειοψηφία αυτών των παραγόντων βρίσκεται σε φάση δοκιμής και μόνο μερικοί χρησιμοποιούνται, ερευνητικά, σε επίπεδο κλινικής πράξης. Μερικοί υποψήφιοι παράγοντες ερευνώνται για δευτερογενή αποτελέσματα σε μελέτες που ασχολούνται με τα άμεσα αποτελέσματα της GSK3b. Από τους κλινικούς υποψήφιους παράγοντες ως αναστολείς της GSK3b η πλειοψηφία των αφορά το πεδίο του καρκίνου. Σε μελέτη φάσης II, το κέντρο Genentech & MD Anderson Cancer στο Τέξας ερευνά τον ρόλο του Erlotinib στο μεταναστευτικό κυτταρικό καρκίνωμα. Ένας από τους στόχους αυτής της μελέτης είναι η αξιολόγηση της μείωσης του σηματοδοτικού μονοπατιού της GSK3b ώστε να αντληθούν περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τη βιολογική απόκριση που έχει στον συγκεκριμένο καρκίνο.

Η χρήση της GSK3b ως βιοδείκτης σε σχέση με το φάρμακο Enzastaurin (αναστέλλει την δραστηριότητα της πρωτεϊνικής κινάσης B - δυνητικό αντινεοπλασματικό



φάρμακο) βρίσκεται υπό δοκιμή φάσης I από το ινστιτούτο Eli Lilly & National Cancer. Αυτά έρχονται επιπρόσθετα στις μελέτες φαρμακολογικής ασφάλειας που πραγματοποιούνται για τη συνδυασμένη θεραπεία με Enzastaurin και Bevacizumab (μονοκλωνικό αντίσωμα - αναστολέας του αυξητικού παράγοντα του αγγειακού ενδοθηλίου) σε ασθενείς με μεταστατικό καρκίνο. Η Enzastaurin σε συνδυασμό με την καρβοπλατίνη μελετάται σε δοκιμή φάσης I σε όγκους του κεντρικού νευρικού συστήματος. Σε αυτή τη μελέτη η ενεργοποίηση της GSK3b σε περιφερικά μονοκύτταρα του αίματος συσχετίστηκε με κλινικά αποτελέσματα.

Επιπλέον, σε μία πρόσφατη συνδυαστική μελέτη των Vogl et al. (Vogl et al., 2009) της Enzastaurin με άλλους παράγοντες στόχευσης το 2009, αναφέρθηκε ότι ο συνδυασμός του Sorafenib (αντιαγγειοκινητικές και αντιπολλαπλασιαστικές ιδιότητες) και του Sunitinib (αναστέλλει πολλαπλούς υποδοχείς τυροσινικών κινασών (RTKs) που εμπλέκονται στην αύξηση του όγκου και τη νεοαγγειογένεση) μαζί με Enzasaturin έδειξε συνεργική μείωση των καρκινώματος των νεφρικών κυττάρων. Αυτό οφείλονταν στην αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης. Ο ανασταλτικός ρόλος της GSK3b στη νόσο Alzheimer μελετάται από το Εθνικό Ινστιτούτο Νευρολογικών Διαταραχών & Εγκεφαλικών της Αμερικής (NINDS) με λίθιο και με την ταυτόχρονη χρήση του φαρμάκου Divalproex. Αυτό μάλλον μειώνει την φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης Tau για τη μείωση του παθογενετικού φαινομένου της νόσου Alzheimer.

Για άλλες νευρολογικές νόσους, η ανασταλτική δράση της GSK3b με λίθιο και βαλπροϊκό οξύ βρίσκεται υπό μελέτη.

Στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Nates μελετάται η επίδραση του βαλπροϊκού οξέος στην αναστολή της GSK3b και στη μείωση της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης Tau με στόχο την «νευροπροστασία». Το Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS) ανέλυσε την επίδραση του λίθιου στην GSK3b η οποία μείωσε την φωσφορυλίωση της Tau ως δευτερεύον αποτέλεσμα. Η Neuropharma, η οποία είναι μια ιδιωτική εταιρία που αναπτύσσει ενδορινικές φαρμακευτικές θεραπείες για διαταραχές του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ). έχει αναφέρει την προώθηση αναστολέων της GSK3b σε κλινικές δοκιμές φάσης I ωστόσο περισσότερες λεπτομέρειες δεν είναι ακόμη γνωστές. Επίσης άλλες μεγάλες φαρμακευτικές εταιρείες όπως η Pfizer, η Chiron, η Vertex και άλλες εστιάζουν στην παραγωγή αναστολέων της GSK3b για διάφορες θεραπευτικές περιπτώσεις.

## 2.6 Ρόλος GSK3 σαν φαρμακολογικός στόχος στον καρκίνο

Η διαθεσιμότητα των δομικών πληροφοριών οδήγησε σε μελέτες μοριακών μοντέλων πάνω σε αυτόν τον στόχο. Διάφορες τέτοιες μελέτες σχετικά με τα συμπλέγματα των συνδέσμων της GSK3b έχουν αναφερθεί. Επίσης, διάφοροι μελετητές έχουν πραγματοποιήσει μελέτες σχετικά με τη δομική ενεργότητα της GSK3b (Martinez et al., 2005; Polgar et al., 2005; Lather et al., 2008; Prasanna et al., 2009). Μελέτες, επίσης, έδειξαν τον τρόπο πρόσδεσης στα συμπλέγματα της GSK3b (Gadakar et al., 2007). Αυτές οι μελέτες εστίασαν σε πειράματα αντίθετης σύζευξης των συνδέσμων με τις δομές της PDB. Παρότι η GSK3b είναι ένας ενδιαφέρον στόχος για φαρμακευτική ανακάλυψη, οι πολλαπλοί της ρόλοι σε διαφορετικά σηματοδοτικά μονοπάτια θέτουν το θέμα της και επιλεκτικότητας των φαρμάκων. Ο Cohen (2001) ανέδειξε τον κίνδυνο ότι η παρατεταμένη χρήση ενός αναστολέα της GSK3b θα μπορούσε να είναι δυνητικά καρκινογόνος. Αυτό αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα κατά το σχεδιασμό των αναστολέων της GSK3b για συνεχόμενη χρήση σε ασθένειες όπως ο διαβήτης και οι νευροεκφυλιστικές νόσοι.

Ωστόσο, σύμφωνα με τη μελέτη των Frame et al (Frame et al., 2001) υπάρχει μία νέα προσέγγιση στο σχεδιασμό των αναστολέων της GSK3b που δεν επηρεάζει τη σηματοδότηση WNT που είναι υπεύθυνη για την ανάπτυξη καρκίνου. Η μετάλλαξη της αργινίνης στη θέση 96 ακυρώνει την φωσφορυλίωση των αρχικών συνθασών γλυκογόνου και αναστέλλει την υποβοηθούμενη, από το PKB, φωσφορυλίωση της σερίνης στη θέση 9. Έτσι, τα φωσφορυλιωμένα αμινοτελικά άκρα δρουν ως ψευδοϋπόστρωμα, καταλαμβάνοντας τις ίδιες θέσεις πρόσδεσης των φωσφορυλομάδων που χρησιμοποιούνται από τα αρχικά υποστρώματα. Ακόμη, αυτή η μετάλλαξη δεν επηρεάζει τη φωσφορυλίωση των πρωταρχικών υποστρωμάτων στο σηματοδοτικό μονοπάτι WNT. Αυτή η υπόθεση αποφεύγει την ογκογονιδιακή δυνατότητα των αναστολέων της GSK3b κι έχει οδηγήσει σε νέες προσεγγίσεις ως προς τον σχεδιασμό και την ανάπτυξη περισσότερο εκλεκτικών αναστολέων της GSK3b για την αντιμετώπιση του διαβήτη χωρίς την πρόκληση καρκίνου. Μία παρόμοια προσέγγιση καταγράφηκε για το σχεδιασμό και την ανάπτυξη αναστολέων της GSK3b για τη νόσο Alzheimer παρακάμπτοντας την ογκογονιδιακή δυνατότητα των αναστολέων της GSK3b (Martinez and Perez, 2008).

Η GSK3b καθιερώνεται ολοένα και περισσότερο ως ένας φαρμακευτικός στόχος-κλειδί με κάποια σκευάσματα να βρίσκονται ήδη σε κλινική φάση φαρμακευτικής ανάπτυξης. Σε αυτή την εργασία παρουσιάζεται κατανοητά ο ρόλος της GSK3b σε μεταβολικές και θεραπευτικές ενδείξεις με σκοπό να αποκαλυφθεί πλήρως η λειτουργία της.

Η ανάλυση των μελετών και των ερευνών γύρω από τον ρόλο της GSK3b δείχνει ότι η GSK3b είναι σημαντική σε διάφορους μηχανισμούς που προκαλούν ασθένειες όπως ο καρκίνος, ο διαβήτης, η καρδιακή υπερτροφία, η νόσος Alzheimer και άλλες διαταραχές του κεντρικού νευρικού συστήματος. Επίσης έχουν αναλυθεί και συζητηθεί τα θέματα για την ανάπτυξη ρυθμιστών της GSK3b κι έχει επισημανθεί η τωρινή κατάσταση των σκευασμάτων στην κλινική φάση της φαρμακευτικής ανάπτυξης.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η GSK3 φαίνεται να είναι μια κινάση η οποία μπορεί να προσαρμοστεί και να στρατολογηθεί εξελικτικά για να φωσφορυλιώνει πάνω από 100 διαφορετικά υποστρώματα. Με αυτόν τον τρόπο έχει καταφέρει να συμμετέχει στη ρύθμιση πολυάριθμων κυτταρικών λειτουργιών. Αυτή η ευελιξία και η προσαρμοστικότητα μπορεί να προέρχεται από τους πολλούς πολύπλοκους μηχανισμούς που ρυθμίζουν τις δράσεις της GSK3, εξασφαλίζοντας ότι φωσφορυλιώνει υποστρώματα μόνο στον κατάλληλο χρόνο και σε διακριτά υποκυτταρικά διαμερίσματα, τα οποία συχνά δημιουργούνται από συμπλέγματα πρωτεϊνών. Έτσι, οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, η πρόσδεση του υποστρώματος, η κυτταρική διακίνηση και τα σύμπλοκα πρωτεϊνών συμβάλλουν στην αυστηρή και ακριβή ρύθμιση της GSK3.

Παρόλο που η GSK3 έχει επιδείξει αξιοσημείωτη εξελικτική προσαρμοστικότητα, κάθε νέο υπόστρωμα της GSK3, καθώς και κάθε νέος μηχανισμός ρύθμισης της δραστηριότητας της GSK3, παρέχει νέες πιθανές θέσεις που μπορεί να είναι επιρρεπείς σε προσβολές που σχετίζονται με ασθένειες. Εικάζεται ότι αυτο-ενεργοποιώντας τους μηχανισμούς με τους οποίους η GSK3 προωθεί τη δική της περαιτέρω ενεργοποίηση μπορεί να είναι ιδιαίτερα σημαντική η δράση της σε ορισμένες διαταραχές και θεραπευτικές παρεμβάσεις. Εάν ένα μέρος της GSK3 είναι ανώμαλα ενεργοποιημένο στα αρχικά στάδια μιας ασθένειας, περιγράφηκαν σε αυτήν την εργασία ορισμένοι μηχανισμοί με τους οποίους η GSK3 μπορεί περαιτέρω να αυξήσει την ενεργοποίησή της. Με βάση αυτό το γεγονός, είναι εύκολο να βγει το συμπέρασμα με ποιο τρόπο μια αρχικά μικρή δυσλειτουργία στην δράση της GSK3 μπορεί να ενισχυθεί καθώς η ασθένεια προχωράει για την προώθηση της παθολογίας. Έτσι, μια παρεμβολή στο πρώτο στάδιο που σχετίζεται με μια διαταραχή μπορεί να βλάψει έναν από τους ανασταλτικούς μηχανισμούς που ρυθμίζουν την δράση της GSK3 και επιλεκτικά να οδηγηθεί σε προσβολή της οδού σηματοδότησης που με την σειρά της οδηγεί στην παθογένεια μιας ασθένειας.

Η μη φυσιολογικά ενεργοποιημένη GSK3 θα μπορούσε στη συνέχεια να αυτοενεργοποιηθεί περαιτέρω με έναν ή περισσότερους από τους μηχανισμούς που περιγράφηκαν στην παρούσα εργασία και καθώς συμβαίνει αυτό, στην παθολογική κατάσταση που προκαλείται από την προσβολή, η GSK3 θα μπορούσε να προάγει

την παθολογία διατηρώντας ταυτόχρονα την κανονική δραστηριότητα σε άλλες κυτταρικές λειτουργίες.

Το γεγονός αυτό αυξάνει την πιθανότητα ότι μια μέτρια αναστολή της GSK3 μπορεί να έχει μια ιδιαίτερα σημαντική επίδραση στους μηχανισμούς αυτό-ενεργοποίησης που συνδέονται με την εκάστοτε ασθένεια. Με άλλα λόγια, η εξασθένηση της αυτο-ενίσχυσης της δραστηριότητας της GSK3 που σχετίζεται με κάθε ξεχωριστή νόσο μπορεί να είναι επαρκής για να είναι θεραπευτικά ευεργετική και σίγουρα πιο ανεκτή σε σύγκριση με την εκτεταμένη αναστολή της GSK3.

Υπάρχει ένας αξιοσημείωτος αριθμός ασθενειών και άλλων παθολογικών καταστάσεων που έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να βελτιωθούν με τη χορήγηση αναστολέων της GSK3 σε πειραματικές εργασίες με ζωικά μοντέλα. Για τη διαδικασία της μετάφρασης που αφορά διάφορες ανθρώπινες ασθένειες, φαίνεται ότι στις περισσότερες περιπτώσεις οι θεραπευτικοί στόχοι δεν θα πρέπει να στοχεύουν στην επίτευξη υψηλού βαθμού αναστολής της GSK3, επειδή αυτό θα ήταν πιθανόν τοξικό λόγω των πολλαπλών ενεργειών της GSK3.

Αντίθετα, οι στόχοι για το εγγύς μέλλον θα πρέπει να είναι η ανακάλυψη φαρμάκων που θα στοχεύουν την δράση της GSK3 σε συγκεκριμένες νοσηρές διεργασίες και σε συγκεκριμένες ασθένειες, όπως φάρμακα που εστιάζουν ειδικά στις αλληλεπιδράσεις της GSK3 με τα συγκεκριμένα για αυτήν υποστρώματα που δεν ρυθμίζονται σε μεμονωμένες ασθένειες ή σε φάρμακα που ελαφρώς αλλά επαρκώς παρεμποδίζουν την GSK3 για την πρόληψη της αυτο-ενεργοποίησης σε παθολογικές διεργασίες.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Torre L, Bray F, Siegel R, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 65(2): 87-108.
- Hegde M, Mali A, Chandorkar S (2013). What is a cancer cell? Why does it metastasize *Asian Pac J Cancer Prev.* 14(6): 3987-9.
- Embi N, Rylatt DB, Cohen P (1980). Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase and phosphorylase kinase. *Eur J Biochem* 107: 519–527.
- Gum RJ, Gaede LL, Koterski SL, Heindel M, Clampit JE, Zinker BA et al. (2003). Reduction of protein tyrosine phosphatase 1B increases insulin-dependent signaling in ob/ob mice. *Diabetes* 52: 21–28.
- Ring DB, Johnson KW, Henriksen EJ, Nuss JM, Goff D, Kinnick TR et al. (2003). Selective glycogen synthase kinase 3 inhibitors potentiate insulin activation of glucose transport and utilization in vitro and in vivo. *Diabetes* 52: 588–595.
- Hsiung SC, Adlersberg M, Arango V, Mann JJ, Tamir H, Liu KP (2003). Attenuated 5-HT1A receptor signaling in brains of suicide victims: involvement of adenylyl cyclase, phosphatidylinositol 3-kinase, Akt and mitogen-activated protein kinase. *J Neurochem* 87: 182–194.
- Smith E, Frenkel B (2005). Glucocorticoids inhibit the transcriptional activity of LEF/TCF in differentiating osteoblasts in a glycogen synthase kinase-3beta-dependent and -independent manner. *J Biol Chem* 280: 2388–2394.
- Robertson LA, Kim AJ, Werstuck GH (2006). Mechanisms linking diabetes mellitus to the development of atherosclerosis: a role for endoplasmic reticulum stress and glycogen synthase kinase-3. *Can J Physiol Pharmacol* 84: 39–48.
- Inoki K, Ouyang H, Zhu T, Lindvall C, Wang Y, Zhang X et al. (2006). TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3b to regulate cell growth. *Cell* 126: 955–968.
- Morisco C, Seta K, Hardt SE, Lee Y, Vatner SF, Sadoshima J (2001). Glycogen synthase kinase 3beta regulates GATA4 in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 276: 28586–28597.

- Bhat RV, Shanley J, Correll MP (2000). 1 Regulation and localization of tyrosine216 phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  in cellular and animal models of neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 11074–11079.
- Sayas CL, Ariaens A, Ponsioen B, Moolenaar WH (2006). GSK-3 is activated by the tyrosine kinase Pyk2 during LPA1-mediated neurite retraction. *Mol Biol Cell* 17: 1834–1844.
- Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H et al. (2000). The protein data bank. *Nucleic Acids Res* 28: 235–242.
- Bussiere DE, He M, Le VP, Jansen JM, Chin S, Martin E (2002). Characterisation of GSK3 $\beta$  protein and methods of use thereof. WO 02/24893 A2.
- Martinez A, Alonso M, Castro A, Dorronsoro I, Gelpi JL, Luque FJ et al. (2005). SAR and 3D-QSAR studies on thiadiazolidinone derivatives: exploration of structural requirements for glycogen synthase kinase 3 inhibitors. *J Med Chem* 48: 7103–7112.
- Polgar T, Baki A, Szendrei GI, Keseru GM (2005). Comparative virtual and experimental high-throughput screening for glycogen synthase kinase-3 $\beta$  inhibitors. *J Med Chem* 48: 7946–7959.
- Lather V, Jagmohan SS, Kristam R, Karthikeyan NA, Balaji VN (2008). QSAR models for prediction of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  inhibitory activity of indirubin derivatives. *QSAR Combi Sci* 27: 718–728.
- Prasanna S, Daga PR, Xie A, Doerksen RJ (2009). Glycogen synthase kinase-3 inhibition by 3-anilino-4-phenylmaleimides: insights from 3D-QSAR and docking. *J Comput Aided Mol Des* 23: 113–127.
- Gadakar PK, Phukan S, Dattatreya P, Balaji VN (2007). Pose prediction accuracy in docking studies and enrichment of actives in the active site of GSK-3 $\beta$ . *J Chem Inf Model* 47: 1446–1459.
- Cohen P (2001). The role of protein phosphorylation in human health and disease. The Sir Hans Krebs Medal Lecture. *Eur J Biochem* 268: 5001–5010.
- Frame S, Cohen P, Biondi RM (2001). A common phosphate binding site explains the unique substrate specificity of GSK3 $\beta$  and its inactivation by phosphorylation. *Mol Cell* 7: 1321–1327.
- Martinez A, Perez DI (2008). GSK-3 inhibitors: a ray of hope for the treatment of Alzheimer's disease? *J Alzheimers Dis* 15: 181–191.

- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673–4680.
- Bjornsti MA, Houghton PJ. The TOR pathway: a target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4:335–348.
- Beurel E. Regulation by glycogen synthase kinase-3 of inflammation and T cells in CNS diseases. *Front Mol Neurosci*. 2011; 4:18.
- Beurel E, Mines MA, Song L, Jope RS. Glycogen synthase kinase-3 levels and phosphorylation undergo large fluctuations in mouse brain during development. *Bipolar Disord*. 2012; 14:822–830.
- Lachman HM, Pedrosa E, Petruolo OA, Cockerham M, Papolos A, Novak T, et al. Increase in GSK3b gene copy number variation in bipolar disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2007; 144B:259–265.
- Benedetti F, Bernasconi A, Lorenzi C, Pontiggia A, Serretti A, Colombo C, et al. A single nucleotide polymorphism in glycogen synthase kinase 3 $\beta$  promoter gene influences onset of illness in patients affected by bipolar disorder. *Neurosci Lett*. 2004a; 355:37–40.
- Benedetti F, Serretti A, Colombo C, Lorenzi C, Tubazio V, Smeraldi E. A glycogen synthase kinase 3 $\beta$  promoter gene single nucleotide polymorphism is associated with age at onset and response to total sleep deprivation in bipolar depression. *Neurosci Lett*. 2004b; 368:123–126.
- Benedetti F, Serretti A, Pontiggia A, Bernasconi A, Lorenzi C, Colombo C, et al. Long-term response to lithium salts in bipolar illness is influenced by the glycogen synthase kinase 3 $\beta$ -50 T/C SNP. *Neurosci Lett*. 2005; 376:51–55.
- Szczepankiewicz A, Skibinska M, Hauser J, Slopian A, Leszczynska-Rodziewicz A, Kapelski P, et al. Association analysis of the GSK-3 $\beta$  T-50C gene polymorphism with schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropsychobiology*. 2006a; 53:51–56.
- Adli M, Hollinde DL, Stamm T, Wiethoff K, Tsahuridu M, Kirchheiner J, et al. Response to lithium augmentation in depression is associated with the glycogen synthase kinase 3- $\beta$ -50T/C single nucleotide polymorphism. *Biol Psychiatry*. 2007; 62:1295–1302.



- Tsai SJ, Liou YJ, Hong CJ, Yu YW, Chen TJ. Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  gene is associated with antidepressant treatment response in Chinese major depressive disorder. *Pharmacogenomics J*. 2008; 8:384–390.
- Inkster B, Nichols TE, Saemann PG, Auer DP, Holsboer F, Muglia P, et al. Association of GSK3b polymorphisms with brain structural changes in major depressive disorder. *Arch Gen Psychiatry*. 2009; 66:721–728.
- Inkster B, Nichols TE, Saemann PG, Auer DP, Holsboer F, Muglia P, et al. Pathway-based approaches to imaging genetics association studies: Wnt signaling, GSK3b substrates and major depression. *Neuroimage*. 2010; 53:908–917.
- Saus E, Soria V, Escaramís G, Crespo JM, Valero J, Gutiérrez-Zotes A, et al. A haplotype of glycogen synthase kinase 3 $\beta$  is associated with early onset of unipolar major depression. *Genes Brain Behav*. 2010; 9:799–807.
- Nishiguchi N, Breen G, Russ C, St Clair D, Collier D. Association analysis of the glycogen synthase kinase-3 $\beta$  gene in bipolar disorder. *Neurosci Lett*. 2006; 394:243–245.
- Szczepankiewicz A, Rybakowski JK, Suwalska A, Skibinska M, Leszczynska-Rodziewicz A, Dmitrzak-Weglarczyk M, et al. Association study of the glycogen synthase kinase-3 $\beta$  gene polymorphism with prophylactic lithium response in bipolar patients. *World J Biol Psychiatry*. 2006b; 7:158–161.
- Kwok JB, Hallupp M, Loy CT, Chan DK, Woo J, Mellick GD, et al. GSK3B polymorphisms alter transcription and splicing in Parkinson's disease. *Ann Neurol*. 2005; 58:829–839.
- Schaffer B, Wiedau-Pazos M, Geschwind DH. Gene structure and alternative splicing of glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) in neural and non-neural tissues. *Gene*. 2003; 302:73–81.
- Mukai F, Ishiguro K, Sano Y, Fujita SC. Alternative splicing isoform of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3 $\beta$ . *J Neurochem*. 2002; 81:1073–1083.
- Samaan S, Tranchevent LC, Dardenne E, Polay Espinoza M, Zonta E, Germann S, et al. The Ddx5 and Ddx17 RNA helicases are cornerstones in the complex regulatory array of steroid hormone-signaling pathways. *Nucleic Acids Res*. 2014; 42:2197–2207.
- Wood-Kaczmar A, Kraus M, Ishiguro K, Philpott KL, Gordon-Weeks PR. An alternatively spliced form of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  is targeted to growing neurites and growth cones. *Mol Cell Neurosci*. 2009; 42:184–194.

- Castaño Z, Gordon-Weeks PR, Kypta RM. The neuron-specific isoform of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  is required for axon growth. *J Neurochem*. 2010; 113:117–130.
- Soutar MP, Kim WY, Williamson R, Pegg M, Hastie CJ, McLauchlan H, et al. Evidence that glycogen synthase kinase-3 isoforms have distinct substrate preference in the brain. *J Neurochem*. 2010; 115:974–983.
- Linding R, Jensen LJ, Ostheimer GJ, van Vugt MA, Jørgensen C, Miron IM, et al. Systematic discovery of in vivo phosphorylation networks. *Cell*. 2007; 129:1415–1426.
- Sutherland C. What are the bona fide GSK3 substrates? *Int J Alzheimers Dis*. 2011; 2011:505–607.
- Jope RS, Johnson GVW. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3 (GSK3). *Trends Biochem Sci*. 2004; 29:95–102.
- Frame S, Cohen P, Biondi RM. A common phosphate binding site explains the unique substrate specificity of GSK3 and its inactivation by phosphorylation. *Mol Cell*. 2001; 7:1321–1327.
- ter Haar E, Coll JT, Austen DA, Hsiao HM, Swenson L, Jain J. Structure of GSK3 $\beta$  reveals a primed phosphorylation mechanism. *Nature Structural Biology*. 2001; 8:593–596.
- Dajani R, Fraser E, Roe SM, Yeo M, Good VM, Thompson V, et al. Structural basis for recruitment of glycogen synthase kinase 3 $\beta$  to the axin-APC scaffold complex. *EMBO J*. 2003; 22:494–501.
- Cole AR, Knebel A, Morrice NA, Robertson LA, Irving AJ, Connolly CN, et al. GSK-3 phosphorylation of the Alzheimer epitope within collapsin response mediator proteins regulates axon elongation in primary neurons. *J Biol Chem*. 2004; 279:50176–50180.
- Singh KK. An emerging role for Wnt and GSK3 signaling pathways in schizophrenia. *Clin Genet*. 2013; 83:511–517.
- Stamos JL, Chu ML, Enos MD, Shah N, Weis WI. Structural basis of GSK-3 inhibition by N-terminal phosphorylation and by the Wnt receptor LRP6. *Elife*. 2014; 3: e01998.
- Suzuki T, Bridges D, Nakada D, Skiniotis G, Morrison SJ, Lin JD, et al. Inhibition of AMPK Catabolic Action by GSK3. *Mol Cell*. 2013; 50:407–419.

- Iitaka C, Miyazaki K, Akaike T, Ishida N. A role for glycogen synthase kinase-3 $\beta$  in the mammalian circadian clock. *J Biol Chem*. 2005; 280:29397–29402.
- Lu Y, Muller M, Smith D, Dutta B, Komurov K, Iadevaia S, et al. Kinome siRNA-phosphoproteomic screen identifies networks regulating AKT signaling. *Oncogene*. 2011; 30:4567–4577.
- Gulen MF, Bulek K, Xiao H, Yu M, Gao J, Sun L, et al. Inactivation of the Enzyme GSK3a by the Kinase IKKi Promotes AKT-mTOR Signaling Pathway that Mediates Interleukin-1-Induced Th17 Cell Maintenance. *Immunity*. 2012; 37:800–812.
- DePaoli-Roach AA. Synergistic phosphorylation and activation of ATP-Mg-dependent phosphoprotein phosphatase by F A/GSK-3 and casein kinase II (PC0.7). *J Biol Chem*. 1984; 259:12144–12152.
- Zhang F, Phiel CJ, Spece L, Gurvich N, Klein PS. Inhibitory phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) in response to lithium. Evidence for autoregulation of GSK-3. *J Biol Chem*. 2003; 278:33067–33077.
- Hughes K, Nikolakaki E, Plyte SE, Totty NF, Woodgett JR. Modulation of the glycogen synthase kinase-3 family by tyrosine phosphorylation. *EMBO J*. 1993; 12:803–808.
- Cole A, Frame S, Cohen P. Further evidence that the tyrosine phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in mammalian cells is an autophosphorylation event. *Biochem J*. 2004b; 377:249–255.
- Goñi-Oliver P, Lucas JJ, Avila J, Hernández F. N-terminal cleavage of GSK-3 by calpain: a new form of GSK-3 regulation. *J Biol Chem*. 2007; 282:22406–22413.
- Goñi-Oliver P, Avila J, Hernández F. Calpain-mediated truncation of GSK-3 in postmortem brain samples. *J Neurosci Res*. 2009; 87:1156–1161.
- Kandasamy AD, Schulz R. Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  is activated by matrix metalloproteinase-2 mediated proteolysis in cardiomyoblasts. *Cardiovasc Res*. 2009; 83:698–706.
- Monteserin-Garcia J, Al-Massadi O, Seoane LM, Alvarez CV, Shan B, Stalla J, et al. Sirt1 inhibits the transcription factor CREB to regulate pituitary growth hormone synthesis. *FASEB J*. 2013; 27:1561–1571.
- Feijis KL, Kleine H, Braczynski A, Forst AH, Herzog N, Verheugd P, et al. ARTD10 substrate identification on protein microarrays: regulation of GSK3b by mono-ADP-ribosylation. *Cell Commun Signal*. 2013; 11:5.

- Rosenthal F, Feijs KL, Frugier E, Bonalli M, Forst AH, Imhof R, et al. Macrodomain-containing proteins are new mono-ADP-ribosylhydrolases. *Nat Struct Mol Biol.* 2013; 20:502–507.
- Stadler SC, Vincent CT, Fedorov VD, Patsialou A, Cherrington BD, Wakshlag JJ, et al. Dysregulation of PAD4-mediated citrullination of nuclear GSK3 $\beta$  activates TGF- $\beta$  signaling and induces epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013; 110:11851–11856.
- Kaidanovich-Beilin O, Woodgett JR. GSK-3: Functional Insights from Cell Biology and Animal Models. *Front Mol Neurosci.* 2011; 4:40.
- Alon LT, Pietrokovski S, Barkan S, Avrahami L, Kaidanovich-Beilin O, Woodgett JR, et al. Selective loss of glycogen synthase kinase-3 $\alpha$  in birds reveals distinct roles for GSK-3 isozymes in tau phosphorylation. *FEBS Lett.* 2011; 585:1158–1162.
- Beurel E, Kaidanovich-Beilin O, Yeh WI, Song L, Palomo V, Michalek SM, et al. Regulation of Th1 cells and experimental autoimmune encephalomyelitis by glycogen synthase kinase-3. *J Immunol.* 2013; 190:5000–5011.
- Iwahana E, Akiyama M, Miyakawa K, Uchida A, Kasahara J, Fukunaga K, et al. Effect of lithium on the circadian rhythms of locomotor activity and glycogen synthase kinase-3 protein expression in the mouse suprachiasmatic nuclei. *Eur J Neurosci.* 2004; 19:2281–2287.
- Lo Monte F, Kramer T, Gu J, Anumala UR, Marinelli L, et al. Identification of glycogen synthase kinase-3 inhibitors with a selective sting for glycogen synthase kinase-3 $\alpha$ . *J Med Chem.* 2012; 55:4407–4424.
- Hoeflich KP, Luo J, Rubie EA, Tsao MS, Jin O, Woodgett JR. Requirement for glycogen synthase kinase-3 $\beta$  in cell survival and NF- $\kappa$ B activation. *Nature.* 2000; 406:86–90.
- Beaulieu JM, Sotnikova TD, Yao WD, Kockeritz L, Woodgett JR, Gainetdinov RR, et al. Lithium antagonizes dopamine-dependent behaviors mediated by an AKT/glycogen synthase kinase 3 signaling cascade. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101:5099–5104.
- Beaulieu JM, Marion S, Rodriguiz RM, Medvedev IO, Sotnikova TD, Ghisi V, et al. A  $\beta$ -arrestin 2 signaling complex mediates lithium action on behavior. *Cell.* 2008; 132:125–136.

- O'Brien WT, Harper AD, Jové F, Woodgett JR, Maretto S, Piccolo S, et al. Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  haploinsufficiency mimics the behavioral and molecular effects of lithium. *J Neurosci*. 2004; 24:6791–6798.
- Bersudsky Y, Shaldubina A, Kozlovsky N, Woodgett JR, Agam G, Belmaker RH. Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  heterozygote knockout mice as a model of findings in postmortem schizophrenia brain or as a model of behaviors mimicking lithium action: negative results. *Behav Pharmacol*. 2008; 19:217–224.
- Kaidanovich-Beilin O, Lipina TV, Takao K, van Eede M, Hattori S, Laliberté C, et al. Abnormalities in brain structure and behavior in GSK-3 $\alpha$  mutant mice. *Mol Brain*. 2009; 2:35.
- Maurin H, Lechat B, Dewachter I, Ris L, Louis JV, Borghgraef P, et al. Neurological characterization of mice deficient in GSK3 $\alpha$  highlight pleiotropic physiological functions in cognition and pathological activity as Tau kinase. *Mol Brain*. 2013; 6:27.
- Wang QM, Park IK, Fiol CJ, Roach PJ, DePaoli-Roach AA. Isoform differences in substrate recognition by glycogen synthase kinases 3 $\alpha$  and 3 $\beta$  in the phosphorylation of phosphatase inhibitor 2. *Biochemistry*. 1994; 33:143–147.
- Miller MW, Caracciolo MR, Berlin WK, Hanover JA. Phosphorylation and glycosylation of nucleoporins. *Arch Biochem Biophys*. 1999; 367:51–60.
- Liang MH, Chuang DM. Differential roles of glycogen synthase kinase-3 isoforms in the regulation of transcriptional activation. *J Biol Chem*. 2006; 281:30479–30484.
- Soutar MP, Kim WY, Williamson R, Pegg M, Hastie CJ, McLauchlan H, et al. Evidence that glycogen synthase kinase-3 isoforms have distinct substrate preference in the brain. *J Neurochem*. 2010; 115:974–983.
- Banerji V, Frumm SM, Ross KN, Li LS, Schinzel AC, Hahn CK, et al. The intersection of genetic and chemical genomic screens identifies GSK-3 $\alpha$  as a target in human acute myeloid leukemia. *J Clin Invest*. 2012; 122:935–947.
- Zeidner LC, Buescher JL, Phiel CJ. A novel interaction between Glycogen Synthase Kinase-3 $\alpha$  (GSK-3 $\alpha$ ) and the scaffold protein Receptor for Activated C-Kinase 1 (RACK1) regulates the circadian clock. *Int J Biochem Mol Biol*. 2011; 2:318–327.
- Phiel CJ, Wilson CA, Lee VM, Klein PS. GSK-3 $\alpha$  regulates production of Alzheimer's disease amyloid- $\beta$  peptides. *Nature*. 2003; 423:435–439.

- Hurtado DE, Molina-Porcel L, Carroll JC, Macdonald C, Aboagye AK, Trojanowski JQ, et al. Selectively silencing GSK-3 isoforms reduces plaques and tangles in mouse models of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2012; 32:7392–7402.
- Ly PT, Wu Y, Zou H, Wang R, Zhou W, et al. Inhibition of GSK3b-mediated BACE1 expression reduces Alzheimer-associated phenotypes. *J Clin Invest*. 2013; 123:224–235.
- Zhou J, Freeman TA, Ahmad F, Shang X, Mangano E, Gao E, et al. GSK-3 $\alpha$  is a central regulator of age-related pathologies in mice. *J Clin Invest*. 2013; 123:1821–1832.
- Beurel E, Jope RS. Differential regulation of STAT family members by glycogen synthase kinase-3. *J Biol Chem*. 2008; 283:21934–21944.
- Ding Q, He X, Hsu JM, Xia W, Chen CT, Li LY, et al. Degradation of Mcl-1 by  $\beta$ -TrCP mediates glycogen synthase kinase 3-induced tumor suppression and chemosensitization. *Mol Cell Biol*. 2007; 27:4006–4017.
- Pilot-Storck F, Chopin E, Rual JF, Baudot A, Dobrokhotov P, Robinson-Rechavi M, et al. Interactome mapping of the phosphatidylinositol 3-kinase-mammalian target of rapamycin pathway identifies deformed epidermal autoregulatory factor-1 as a new glycogen synthase kinase-3 interactor. *Mol Cell Proteomics*. 2010; 9:1578–1593.
- Hooper C, Markevich V, Plattner F, Killick R, Schofield E, Engel T, et al. Glycogen synthase kinase-3 inhibition is integral to long-term potentiation. *Eur J Neurosci*. 2007; 25:81–86.
- Dewachter I, Ris L, Jaworski T, Seymour CM, Kremer A, Borghgraef P, et al. GSK3b, a centre-staged kinase in neuropsychiatric disorders, modulates long term memory by inhibitory phosphorylation at serine-9. *Neurobiol Dis*. 2009; 35:193–200.
- Peineau S, Taghibiglou C, Bradley C, Wong TP, Liu L, Lu J, et al. LTP inhibits LTD in the hippocampus via regulation of GSK3b. *Neuron*. 2007; 53:703–717.
- Shahab L, Plattner F, Irvine EE, Cummings DM, Edwards FA. Dynamic range of GSK3a not GSK3b is essential for bidirectional synaptic plasticity at hippocampal CA3-CA1 synapses. *Hippocampus*. 2014 in press.
- King MK, Pardo M, Cheng Y, Downey K, Jope RS, Beurel E. Glycogen synthase kinase-3 inhibitors: Rescuers of cognitive impairments. *Pharmacol Ther*. 2014; 141:1–12.

- Force T, Woodgett JR. Unique and overlapping functions of GSK-3 isoforms in cell differentiation and proliferation and cardiovascular development. *J Biol Chem.* 2009; 284:9643–9647.
- Cho J, Rameshwar P, Sadoshima J. Distinct roles of glycogen synthase kinase (GSK)-3 $\alpha$  and GSK-3 $\beta$  in mediating cardiomyocyte differentiation in murine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Biol Chem.* 2009; 284:36647–36658.
- Lal H, Zhou J, Ahmad F, Zaka R, Vagnozzi RJ, Decaul M, et al. Glycogen synthase kinase-3 $\alpha$  limits ischemic injury, cardiac rupture, post-myocardial infarction remodeling and death. *Circulation.* 2012; 125:65–75.
- Goode N, Hughes K, Woodgett JR, Parker PJ. Differential regulation of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  by protein kinase C isotypes. *J Biol Chem.* 1992; 267:16878–16882.
- Brognard J, Sierrecki E, Gao T, Newton AC. PHLPP and a second isoform, PHLPP2, differentially attenuate the amplitude of Akt signaling by regulating distinct Akt isoforms. *Mol Cell.* 2007; 25:917–931.
- Mondelli V, Anacker C, Vernon AC, Cattaneo A, Natesan S, Modo M, et al. Haloperidol and olanzapine mediate metabolic abnormalities through different molecular pathways. *Transl Psychiatry.* 2013; 3:e208.
- Manoukian AS, Woodgett JR. Role of glycogen synthase kinase-3 in cancer: regulation by Wnts and other signaling pathways. *Adv Cancer Res.* 2002; 84:203–229.
- Ougolkov AV, Billadeau DD. Targeting GSK-3: a promising approach for cancer therapy? *Future Oncol.* 2006; 2:91–100.
- Mills CN, Newsheer S, Bonner JA, Yang ES. Emerging roles of glycogen synthase kinase 3 in the treatment of brain tumors. *Front Mol Neurosci.* 2011; 4:47.
- McCubrey JA, Steelman LS, Bertrand FE, Davis NM, Abrams SL, et al. Multifaceted roles of GSK-3 and Wnt/ $\beta$ -catenin in hematopoiesis and leukemogenesis: opportunities for therapeutic intervention. *Leukemia.* 2014; 28:15–33.
- Polakis P. The many ways of Wnt in cancer. *Curr Opin Genet Dev.* 2007; 17:45–51.
- Leis H, Segrelles C, Ruiz S, Santos M, Paramio JM. Expression, localization, and activity of glycogen synthase kinase 3 $\beta$  during mouse skin tumorigenesis. *Mol Carcinog.* 2002; 35:180–185.

- Ma C, Wang J, Gao Y, Gao TW, Chen G, Bower KA, et al. The role of glycogen synthase kinase 3 $\beta$  in the transformation of epidermal cells. *Cancer Res.* 2007; 67:7756–7764.
- Farago M, Dominguez I, Landesman-Bollag E, Xu X, Rosner A, Cardiff RD, et al. Kinase-inactive glycogen synthase kinase 3 $\beta$  promotes Wnt signaling and mammary tumorigenesis. *Cancer Res.* 2005; 65:5792–5801.
- Armanious H, Deschenes J, Gelebart P, Ghosh S, Mackey J, Lai R. Clinical and biological significance of GSK-3 $\beta$  inactivation in breast cancer-an immunohistochemical study. *Hum Pathol.* 2010; 41:1657–1663.
- Dembowy J, Adissu HA, Liu JC, Zacksenhaus E, Woodgett JR. Effect of glycogen synthase kinase-3 inactivation on mouse mammary gland development and oncogenesis. *Oncogene.* 2014 Sep 8.
- Vincent T, Kukalev A, Andäng M, Pettersson R, Percipalle P. The glycogen synthase kinase (GSK) 3 $\beta$  represses RNA polymerase I transcription. *Oncogene.* 2008; 27:5254–5259.
- Shakoori A, Mai W, Miyashita K, Yasumoto K, Takahashi Y, Ooi A, et al. Inhibition of GSK-3 $\beta$  activity attenuates proliferation of human colon cancer cells in rodents. *Cancer Sci.* 2007; 98:1388–1393.
- Ougolkov AV, Fernandez-Zapico ME, Savoy DN, Urrutia RA, Billadeau DD. Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  participates in nuclear factor kappaB-mediated gene transcription and cell survival in pancreatic cancer cells. *Cancer Res.* 2005; 65:2076–2081.
- Wang Z, Smith KS, Murphy M, Piloto O, Somervaille TC, Cleary ML. Glycogen synthase kinase 3 in MLL leukaemia maintenance and targeted therapy. *Nature.* 2008; 455:1205–1209.
- Mulholland DJ, Dedhar S, Wu H, Nelson CC. PTEN and GSK3b: key regulators of progression to androgen-independent prostate cancer. *Oncogene.* 2006; 25:329–337.
- Darrington RS, Campa VM, Walker MM, Bengoa-Vergniory N, Gorrondo-Etxebarria I, Uysal-Onganer P, et al. Distinct expression and activity of GSK-3 $\alpha$  and GSK-3 $\beta$  in prostate cancer. *Int J Cancer.* 2012; 131:E872–883.
- Beurel E, Jope RS. The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways. *Prog Neurobiology.* 2006; 79:173–189.



- Sun M, Song L, Li Y, Zhou T, Jope RS. Identification of an anti-apoptotic protein complex at death receptors. *Cell Death Differentiation*. 2008; 15:1887–1900.
- Gómez-Sintes R, Lucas JJ. NFAT/Fas signaling mediates the neuronal apoptosis and motor side effects of GSK-3 inhibition in a mouse model of lithium therapy. *J Clin Invest*. 2010; 120:2432–2445.
- Liang J, Slingerland JM (2003). Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression. *Cell Cycle* 2: 339–345.
- Inoki K, Ouyang H, Zhu T, Lindvall C, Wang Y, Zhang X et al. (2006). TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3b to regulate cell growth. *Cell* 126: 955–968.
- Viatour P, Dejardin E, Warnier M, Lair F, Claudio E, Bureau F et al. (2004). GSK3b-mediated BCL-3 phosphorylation modulates its degradation and its oncogenicity. *Mol Cell* 16: 35–45.
- Gomez-Ramos A, Dominguez J, Zafra D, Corominola H, Gomis R, Guinovart JJ et al. (2006). Sodium tungstate decreases the phosphorylation of tau through GSK3b inactivation. *J Neurosci Res* 83: 264–273.
- Sagae S, Kobayashi K, Nishioka Y, Sugimura M, Ishioka S, Nagata M et al. (1999). Mutational analysis of beta-catenin gene in Japanese ovarian carcinomas: frequent mutations in endometrioid carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 90: 510–515.
- Ohira T, Gemmill RM, Ferguson K, Kusy S, Roche J, Brambilla E et al. (2003). WNT7a induces E-cadherin in lung cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 10429–10434.
- Lenferink AE, Busse D, Flanagan WM, Yakes FM, Arteaga CL (2001). ErbB2/neu kinase modulates cellular p27(Kip1) and cyclin D1 through multiple signaling pathways. *Cancer Res* 61: 6583–6591.
- Jong IY, Li X-Y, Ota I, Hu C, Kim HS, Kim NH et al. (2006). A Wnt-Axin2–GSK3b cascade regulates Snail1 activity in breast cancer cells. *Nat Cell Biol* 8: 1398–1406.
- Prasad CP, Rath G, Mathur S, Bhatnagar D, Parshad R, Ralhan R (2009). Expression analysis of E-cadherin, Slug and GSK3b in Invasive ductal carcinoma of breast. *BMC Cancer* 9: 325.
- Thiel A, Heinonen M, Rintahaka J, Hallikainen T, Hemmes A, Dixon DA et al. (2006). Expression of cyclooxygenase-2 is regulated by glycogen synthase kinase-3beta in gastric cancer cells. *J Biol Chem* 281: 4564–4569.

- Sharma M, Chuang WW, Sun Z (2002). Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt stimulates androgen pathway through GSK3 $\beta$  inhibition and nuclear  $\beta$ -catenin accumulation. *J Biol Chem* 277: 30935–30941.
- Koul D, Shen R, Bergh S, Lu Y, de Groot JF, Liu TJ et al. (2005). Targeting integrin-linked kinase inhibits Akt signaling pathways and decreases tumor progression of human glioblastoma. *Mol Cancer Ther* 4: 1681–1688.
- Devesa, S. S.; Blot, W. J.; Stone, B. J.; Miller, B. A.; Tarone, R. E.; Fraumeni, J. F. Recent cancer trends in the United States. *J. Natl. Cancer I.* 1995, 87, 175-182.
- Duffy, J. P.; Eibl, G.; Reber, H. A.; Hines, O. J. Influence of hypoxia and neoangiogenesis on the growth of pancreatic cancer. *Mol. Cancer* 2003, 2, 12.
- Tisdale, M. Cachexia in cancer patients. *Cancer* 2002, 2, 862-871.
- Warshaw, A. L.; Gu, Z. Y.; Wittenberg, J.; Waltman, A. C. Preoperative staging and assessment of resectability of pancreatic cancer. *Arch. Surg.* 1990, 125, 230-233.
- Rohan, T.; McMichael, A. Z. Alimentary tract cancer mortality in Australia, 1908-1978. An epidemiological appraisal. *Med. J. Aust.* 1981, 1, 232-235.
- Imaizumi, Y. *Mech. Ageing Dev.* 1996, 90, 163-181.
- Levi, F.; Decarli, A.; La Vecchia, C. Longitudinal Gompertzian analysis of mortality from pancreatic cancer in Japan, 1955-1993. *Rev. Epidemiol. Sante Pub.* 1988, 36, 15-15.
- Lilliemoe, K. D.; Yeo, C. J.; Cameron, J. L. Trends in cancer mortality in Switzerland, 1951-1984. *Can. Cancer J. Clin.* 2000, 50, 241-268.
- Ougolkov, A. V.; Fernandez-Zapico, M. E.; Savoy, D. N.; Urrutia, R. A.; Billadau, D. D. Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  participates in nuclear factor kappaB-mediated gene transcription and cell survival in pancreatic cancer cells. *Cancer Res.* 2005, 65, 2076-2081.
- Ougolkov, A. V.; Fernandez-Zapico, M. E.; Bilim, V. N.; Smyrk, T. C.; Chari, S. T.; Billdeau, D. D. Aberrant nuclear accumulation of Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$  in human pancreatic cancer: association with kinase activity and tumour dedifferentiation. *Clin. Cancer Res.* 2006, 12, 5074-5081.
- Arlt, A.; Gehrz, A.; Muerkoster, S.; Vorndamm, J.; Kruse, M.; Folsch, U. R.; Schafer, H. Role of NF-kappaB and Akt/PI3K in the resistance of pancreatic carcinoma cell lines against gemcitabine-induced cell death. *Oncogene* 2003, 22, 3243-3251.

- Buerel, E.; Kornporbst, M.; Blivet-Van Eggelpoel, M. J.; Ruiz-Ruiz, C.; Cardoret, A.; Capeau, J.; Desbois-Mouthon, C. GSK-3 $\beta$  inhibition by lithium confers resistance to chemotherapy-induced apoptosis through the repression of CD95 (Fas/APO-1) expression. *Exp. Cell Res.* 2004, 300, 354-364.
- Al-Aynati, M. M.; Radulovich, N.; Riddell, R. H.; Tsao, M. Epithelialcadherin and beta-catenin expression changes in pancreatic intraepithelial neoplasia. *Clin. Cancer Res.* 2004, 10, 1235-1240.
- Deng, J. S.; Miller, H. Y.; Wang, W.; Xia, Y.; Wen, B. P.; Zhou, Z.; Li, S.; Lin, S.; Hung, M. C. Beta-catenin interacts and inhibits NF-kappaB in human colon and breast cancer. *Cancer Cell* 2002, 2, 323-334.
- Tian D, Zhu M, Chen WS, Li JS, Wu RL, Wang X (2006). Role of glycogen synthase kinase 3 in squamous differentiation induced by cigarette smoke in porcine tracheobronchial epithelial cells. *Food Chem Toxicol* 44: 1590–1596.
- Shakoori A, Ougolkov A, Yu ZW, Zhang B, Modarressi MH, Billadeau DD et al. (2005). Deregulated GSK3 $\beta$  activity in colorectal cancer: its association with tumor cell survival and proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 334: 1365–1373.
- Liao X, Thrasher JB, Holzbeierlein J, Stanley S, Li B (2004). Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  activity is required for androgen-stimulated gene expression in prostate cancer. *Endocrinology* 145: 2941–2949.
- Wang Q, Wang X, Hernandez A, Hellmich MR, Gatalica Z, Evers BM (2002). Regulation of TRAIL expression by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/GSK-3 pathway in human colon cancer cells. *J Biol Chem* 277: 36602–36610.
- Kang T, Wei Y, Honaker Y, Yamaguchi H, Appella E, Hung MC et al. (2008). GSK-3 $\beta$  targets Cdc25A for ubiquitin-mediated proteolysis and GSK-3 $\beta$  inactivation correlates with Cdc25A overproduction in human cancers. *Cancer Cell* 13: 36–47.
- Krymsky MA, Kudryashov DS, Shirinsky VP, Lukas TJ, Watterson DM, Vorotnikov AV (2001). Phosphorylation of kinase-related protein (telokin) in tonic and phasic smooth muscles. *J Muscle Res Cell Motil* 22: 425–437.
- Diehl JA, Cheng M, Roussel MF, Sherr CJ (1998). Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev* 12: 3499–3511.

- Bellei B, Flori E, Izzo E, Maresca V, Picardo M (2008). GSK3b inhibition promotes melanogenesis in mouse B16 melanoma cells and normal human melanocytes. *Cell Signalling* 20: 1750–1761.
  - Welcker M, Singer J, Loeb KR, Grim J, Bloecher A, Gurien-West M et al. (2003). Multisite phosphorylation by Cdk2 and GSK3b controls cyclin E degradation. *Mol Cell* 12: 381–392.
  - Nowicki M, Dmitrieva N, Stein AM, Cutter JL, Godlewski J, Saeki Y et al. (2008). Lithium inhibits invasion of glioma cells; possible involvement of glycogen synthase kinase-3. *Neuro Oncol* 10: 690–699.
  - Cao Q, Lu X, Feng YJ (2006). Glycogen synthase kinase-3beta positively regulates the proliferation of human ovarian cancer cells. *Cell Res* 16: 671–677.
  - Kim W, Wilson P, Morland S, Campbell I, Walsh M, Hurst T et al. (1999). b-Catenin mutation and expression analysis in ovarian cancer: exon 3 mutations and nuclear translocation in 16% of endometrioid tumours. *Int J Cancer* 82: 625–629.
  - Rosano L, Spinella F, Di Castro V, Nicotra MR, Dedhar S, de Herreros AG et al. (2005). Endothelin-1 promotes epithelial-to-mesenchymal transition in human ovarian cancer cells. *Cancer Res* 65: 11649–11657.
  - GA M, Uddin S, Mahmud D, Damacela I, Lavelle D, Ahmed M et al. (2002). Regulation of myeloma cell growth through Akt/GSK3b/forkhead signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 297: 760–764.
- Laure-Emmanuelle Z, Wdziekonski B, Fontaine C, Villageois P, Peraldi P, Dani C (2008). Effects of GSK3b inhibitors on in vitro ex